

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

SILVIA BENEDETTI

**EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO EM ISOFLAVONAS
CONCENTRADAS POR NANOFILTRAÇÃO**

Florianópolis – SC
2010

SILVIA BENEDETTI

**EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO EM ISOFLAVONAS
CONCENTRADAS POR NANOFILTRAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Elane Schwinden Prudêncio

Florianópolis - SC
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

B462e Benedetti, Silvia

Efeito do tratamento térmico em isoflavonas concentradas por nanofiltração [dissertação] / Silvia Benedetti ; orientador, José Carlos Cunha Petrus. - Florianópolis, SC, 2010.

83 p.: il., tabs., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Tecnologia de alimentos. 2. Engenharia de alimentos. 3. Soja. 4. Isoflavonas. 5. Nanofiltração. 6. Concentrado. 7. Tratamento térmico. I. Petrus, Jose Carlos Cunha. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO EM ISOFLAVONAS CONCENTRADAS POR NANOFILTRAÇÃO

SILVIA BENEDETTI

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^ª. Dr^ª. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Elane Schwinden Prudêncio
Co-Orientadora

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus – PGEAL/UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Edna Regina Amante – PGEAL/UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Renata Dias de Mello Castanho Amboni – PGCAL/UFSC

Florianópolis, 30 de abril de 2010

Dedico este trabalho aos meus pais,
Leila e Araujo, pelo amor,
apoio e incentivo nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço Deus, acima de tudo, por se fazer sempre presente na minha vida, dando-me coragem nos momentos difíceis e persistência para buscar novos desafios;

Ao meu orientador Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus e à minha co-orientadora Dra. Elane Schwinden Prudêncio pela orientação, apoio, confiança e pelas valiosas contribuições para realização deste trabalho e para meu crescimento profissional;

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado, e aos professores do programa pelo conhecimento adquirido nesses dois anos;

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite e pelas contribuições ao trabalho;

Aos meus pais Leila e Araujo e meu irmão Bruno, que foram sempre meus grandes incentivadores nessa conquista, por todo apoio e carinho;

À Embrapa Soja, por ceder o espaço físico e a infra-estrutura para realização da parte experimental e aos pesquisadores José Marcos Gontijo Mandarino e Mercedes Carrão-Panizzi pelas valiosas sugestões para o trabalho;

Aos funcionários e estagiários da Embrapa Soja, pelo apoio e amizade e principalmente ao Rodrigo, pelo auxílio na condução dos experimentos e pelo apoio técnico;

Aos colegas do LABSEM, Katia, Léo e Claudimir, pelas idéias, trocas de conhecimento e amizade;

Aos colegas do Programa, em especial Katia, Marta, Patrícia, Daniela, Natália e Darlene, pela valiosa amizade e apoio nos momentos mais difíceis;

À Carla e Gisele, com quem morei nos dois anos do mestrado, pela paciência, compreensão, carinho e amizade;

Às minhas queridas amigas Adriana e Mônia, por se fazerem sempre presentes na minha vida em todos os momentos, mesmo estando distantes;

Ao meu namorado Gustavo, pelo carinho, apoio e incentivo;

À minha amiga Graciela, pela amizade e pela carinhosa acolhida em sua casa durante a realização dos experimentos em Londrina;

À professora Telma Elita Bertolin, da Universidade de Passo Fundo, que foi a grande incentivadora para realização do mestrado, pela motivação, apoio e amizade;

Ao Programa REUNI (Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 1 Revisão bibliográfica.....	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 A soja (Glycine max Merrill).....	21
1.2 As isoflavonas da soja	22
1.3 Processos de Separação por Membranas (PSM).....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO 2 Concentração de isoflavonas da soja por nanofiltração.....	47
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	51
1. INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Material.....	54
2.2 Obtenção do extrato aquoso da farinha desengordurada de soja (FDS).....	55
2.3 Nanofiltração do extrato aquoso de FDS.....	55
2.4 Análise físico-química	57
2.5 Índice de sedimentação (IS).....	58
2.6 Extração e determinação de isoflavonas	58
2.7 Análise estatística	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1 Nanofiltração (NF).....	60
3.2 Análise físico-química	61
3.3 Teores de isoflavonas	62
CONCLUSÃO	67

CAPÍTULO 3 Efeito dos binômios temperatura e tempo no teor de isoflavonas do concentrado aquoso de soja obtido a partir da nanofiltração..... 77

RESUMO 79

ABSTRACT 81

1 INTRODUÇÃO..... 83

2 MATERIAL E MÉTODOS 84

2.1 Material 84

2.2 Elaboração do extrato aquoso da Farinha Desengordurada de Soja (FDS) 84

2.3 Nanofiltração (NF) 85

2.4 Delineamento experimental..... 85

2.5 Tratamento térmico do concentrado obtido a partir do extrato aquoso de FDS 87

2.6 Extração e determinação de isoflavonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..... 87

2.7 Análise estatística 88

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 89

CONCLUSÃO..... 99

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 100

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	Estrutura química das isoflavonas	22
Figura 2	Classificação e estrutura química das isoflavonas	23
Figura 3	Estrutura molecular do hormônio 17 β -estradiol (a) e da genisteína (b)	24
Figura 4	Principais características dos Processos de Separação por Membranas (PSM) de acordo com sua seletividade e força motriz aplicada	28
Figura 5	Principais configurações de módulos de membranas	31
Figura 6	Comparação entre o processo de filtração perpendicular (convencional) e a filtração tangencial e respectivos comportamentos de fluxo em função do tempo	32
Figura 7	Esquema de formação da camada gel na membrana	33

Capítulo 2

Figura 1	Fluxograma das etapas de obtenção do extrato aquoso da Farinha Desengordurada de Soja (FDS)	56
Figura 2	Esquema simplificado da unidade piloto de nanofiltração utilizado nos experimentos	57
Figura 3	Comportamento do fluxo do permeado (J) durante o processo de NF do extrato aquoso de FDS	60

Capítulo 3

Figura 1	Representação do gráfico de Pareto indicando os efeitos do tempo e temperatura sobre o teor de malonil glicosídeos após os tratamentos térmicos dos ensaios avaliados	93
Figura 2	Representação do gráfico de Pareto indicando os efeitos do tempo e temperatura sobre o teor de β -glicosídeos após os tratamentos térmicos dos ensaios avaliados	94
Figura 3	Distribuição normal dos dados observados experimentalmente e dos valores preditos pelo modelo	95
Figura 4	Superfície de resposta para a variação do teor de β -glicosídeos com a temperatura e o tempo	96

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1	Resultado da análise físico-química (médias \pm desvio padrão) das amostras de Farinha Desengordurada de Soja (FDS), do extrato aquoso de FDS e do concentrado obtido pelo processo de nanofiltração	61
Tabela 2	Resultados (médias \pm desvio padrão) de isoflavonas nas amostras de Farinha Desengordurada de Soja (FDS) (mg/100 g), extrato aquoso de FDS (μ g isoflavona/g em base seca) e concentrado obtido através da Nanofiltração (μ g isoflavona/g em base seca)	63

Capítulo 3

Tabela 1	Níveis das variáveis utilizadas no delineamento experimental 2 ²	86
Tabela 2	Matriz do delineamento experimental 2 ² com valores codificados e reais das variáveis independentes	86
Tabela 3	Resultados médios (\pm desvio padrão) dos teores dos conjugados malonil glicosídeos e β -glicosídeos, das agliconas e de isoflavonas totais (mg isoflavona/mL de concentrado) do concentrado obtido a partir da nanofiltração, segundo Delineamento Estatístico Central Composto Rotacional (DCCR 2 ^k)	90
Tabela 4	Análise de variância para as variáveis estudadas sobre o teor de malonil glicosídeos	92
Tabela 5	Análise de variância para as variáveis estudadas tendo como resposta o teor de β -glicosídeos	92
Tabela 6	Análise de variância do processo tendo como resposta o teor de β -glicosídeos	96
Tabela 7	Análise de variância para as variáveis estudadas tendo como resposta o teor de agliconas	97
Tabela 8	Análise de variância para as variáveis estudadas tendo como resposta o teor de isoflavonas totais	98

INTRODUÇÃO

A utilização da soja para a produção de alimentos cresceu nas últimas décadas devido ao forte apelo das pesquisas na área da saúde, destacando seus efeitos benéficos, quando consumidos regularmente. Com isso, os derivados da soja passaram a ganhar um destaque comercial, principalmente devido às suas características funcionais, contribuindo para a geração de novos produtos com essas mesmas propriedades (BARBOSA; ASSUMPÇÃO, 2001; BEHRENS; SILVA, 2004).

Segundo Wang e Murphy (1994), as características funcionais apresentadas pela soja são atribuídas principalmente às isoflavonas, que constituem um grupo de fitoestrógenos que estão associados à prevenção de diversas doenças (ALVES et al., 2010) e também atuam na redução de sintomas relacionados à menopausa (PARK et al., 2009). De acordo com Chun, Kim e Kim (2008), as isoflavonas apresentam-se nas formas químicas conjugadas, representadas pelos β -glicosídeos, malonil glicosídeos e acetil glicosídeos; e nas formas não-conjugadas, como agliconas; sendo que cada forma química possui três isômeros, ou seja, a genistina, a daidzina e a glicitina, totalizando doze isoflavonas. Estes autores relatam que estas diferentes estruturas químicas podem ser responsáveis pela biodisponibilidade destes e, portanto, pela forma de atuação como produto funcional.

O perfil e teores de isoflavonas na soja são influenciados por fatores genéticos e ambientais, com destaque para os seguintes fatores ambientais: temperatura, umidade e tipo de solo (SEGUIN; BODO; ALTAWAHA, 2007). Já o perfil e os teores de isoflavonas encontrados nos alimentos dependem principalmente das condições de processamento utilizados, como tratamentos térmicos, hidrólise enzimática e processos fermentativos (LI-JUN et al., 2004), sendo todos estes controlados visando à obtenção de um produto final com propriedades nutricionais e funcionais adequadas.

Concentrados e/ou isolados contendo propriedades funcionais, obtidos a partir de Processos de Separação por Membranas (PSM) vêm sendo investigados (CASSINI et al., 2010), onde destes, tem-se a ultrafiltração destacando-se na concentração de compostos dos extratos de soja. Uma das razões descritas na literatura, para o seu emprego, seria relativa ao uso de temperaturas menores do que as normalmente

aplicadas nos processos convencionais de concentração, como a evaporação. Desta forma, é creditada às menores temperaturas utilizadas, a manutenção dos componentes funcionais a serem concentrados. Por outro lado, tem se verificado que o emprego da nanofiltração, outro PSM, que faz uso de membranas com menores diâmetros de poros, é mais eficiente na concentração de compostos funcionais dos mais variados extratos. No entanto, trabalhos sobre a concentração de isoflavonas da soja utilizando a nanofiltração, bem como a submissão do concentrado obtido a diferentes temperaturas e tempos, visando avaliar o perfil e o teor de isoflavonas, são inexistentes. Atendendo a este objetivo, o trabalho está apresentando na forma de capítulos:

- (a) Capítulo 1 - Embasamento bibliográfico abordando os principais temas envolvidos no trabalho, tais como soja, isoflavonas da soja e processos de separação por membranas.
- (b) Capítulo 2 - Emprego da nanofiltração para a obtenção de um concentrado, com alto teor de isoflavonas, proveniente de um extrato aquoso de farinha desengordurada de soja, determinando além das suas propriedades físicas e químicas, o perfil e o teor de isoflavonas.
- (c) Capítulo 3 - Avaliação do efeito de diferentes tratamentos térmicos (temperatura *versus* tempo) no teor de isoflavonas no concentrado obtido a partir da nanofiltração do extrato aquoso de Farinha Desengordurada de Soja (FDS).

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A soja (*Glycine max* Merrill)

A soja (*Glycine max* Merrill), planta herbácea de origem chinesa, pertencente à família das leguminosas, foi introduzida no Ocidente em meados do século XVI, chegando ao Brasil no final do século XIX (EMBRAPA SOJA, 2009). De acordo com dados da CONAB (2009), o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, ultrapassando 60 milhões de toneladas de grãos na safra 2009, concentrando a maior produção nos estados do Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul.

A soja é considerada um alimento completo, já que é constituída de aproximadamente 40 % de proteínas, 30 % de carboidratos, 20 % de lipídeos (SGARBIERI; GARRUTI; GUZMÁN, 1981), consideráveis teores de vitaminas do complexo B, minerais (BAZINET et al., 1997; PUPPO; AÑÓN, 1999), lecitinas, saponinas, tocoferóis, inibidores de protease e isoflavonas, sendo estas de grande interesse por suas propriedades funcionais (MAKELA et al., 1994; ESTEVES; MONTEIRO, 2001; BARNES et al., 2006; CHOI; RHEE, 2006).

As proteínas são os nutrientes presentes em maiores quantidades na soja e são ricas em aminoácidos essenciais, como lisina e leucina (PIRES et al., 2006). As proteínas de reserva glicinina e β -conglucina são as mais abundantes, mas também se destacam as lipoxigenases, inibidores de tripsina Kunitz, inibidores de protease de baixa massa molar, lectinas e ureases (MORAES et al., 2006). Além das proteínas, a soja é rica em lipídeos (18-20 %), sendo que, do total, cerca de 15 % são ácidos graxos saturados e 85 % ácidos graxos insaturados (destacando-se os ácidos linoleico e linolênico) (PENALVO et al., 2004). Segundo Moraes et al. (2006), há uma correlação negativa entre o teor de proteínas e o teor de lipídeos na soja, pois à medida que se aumenta o teor de proteína, o teor de óleo é reduzido.

Os carboidratos correspondem a 30 % da composição da soja, sendo que destes 15 % são insolúveis e 85 % solúveis (USB, 2001). Da mesma forma que os lipídeos, quando se aumenta o teor de proteína, o teor de carboidratos também reduz, o que evidencia correlação negativa entre estas duas características também (MORAES et al., 2006). Wilcox e Shibbes (2001) sugerem que o aumento no teor de proteína pode reduzir o teor de açúcares solúveis presentes na fração carboidratos totais, melhorando desta forma a qualidade nutricional do farelo de soja.

Os demais componentes da soja incluem minerais (cálcio, ferro, potássio, magnésio, fósforo, zinco e sódio), vitaminas do complexo B e α -tocoferol (SAIDU, 2005). Kim et al. (2005), afirmam que a soja é considerada um alimento funcional pelas propriedades de suas proteínas e isoflavonas, que exercem ação moduladora em determinados mecanismos fisiológicos. Entretanto, são as isoflavonas as mais importantes por apresentarem atividade fisiológica semelhante ao hormônio estradiol.

1.2 As isoflavonas da soja

As isoflavonas são metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos bioflavonóides, sintetizados quase que exclusivamente por plantas da família *Leguminaceae*. Essas substâncias estão presentes em grandes quantidades na soja, grão de bico, feijão e outros legumes (DEVI et al., 2008) e são conhecidas por suas inúmeras ações químicas bem como atividade antioxidante e anticancerígena (KIM et al., 2005). Já, nas plantas, funcionam como fitoalexinas conferindo-lhes resistência a patógenos (KOGAN, 1986).

A estrutura química das isoflavonas (Figura 1) apresenta um núcleo flavona, composto por dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel heterocíclico (C). A posição do anel benzênico B é a base para a categorização da classe flavonóide (posição 2) e a classe isoflavonóide (posição 3) (ROSTAGNO et al., 2009).

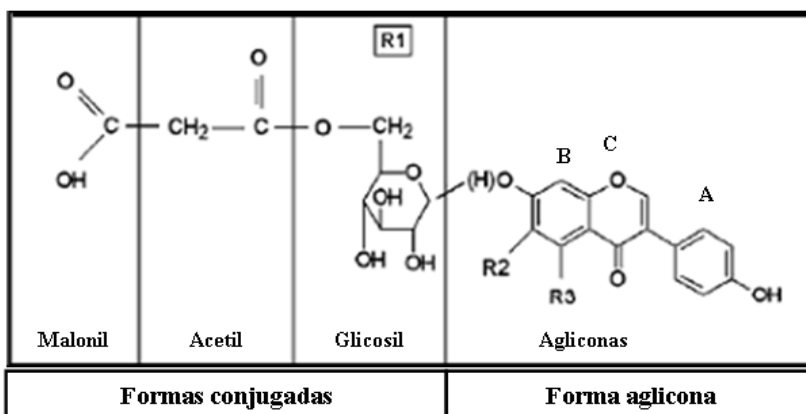


Figura 1 Estrutura química das isoflavonas.

Fonte: Rostagno et al. (2009).

As isoflavonas estão presentes na soja em quatro formas químicas: agliconas, β-glicosídeos, acetil glicosídeos e malonil glicosídeos sendo que cada uma apresenta-se em três classes: genistina, daidzina e glicitina (KAO; CHIEN; CHEN, 2008) (Figura 2). De acordo com Barbosa, Lajolo e Genovese (2006), as diferenças na estrutura química das isoflavonas podem influenciar na sua atividade biológica, na sua biodisponibilidade e nos seus efeitos fisiológicos.

Segundo Tsukamoto et al. (1995), cerca de 80 a 90% do total de isoflavonas dos grãos encontram-se nos cotilédones, sendo que o restante fica no hipocótilo, onde a concentração em base mássica é maior do que nos cotilédones. A quantidade e o tipo de isoflavona presente na soja é afetada pelo ambiente, pelo genótipo e pela interação desses fatores durante o desenvolvimento dos grãos (CARRÃO-PANIZZI; SIMÃO; KIKUCHI, 2003; LEE et al., 2003; LEE et al., 2007).

		R1	R2	R3
Agliconas	Genisteína	H	H	OH
	Daidzeína	H	H	H
	Gliciteína	H	OCH ₃	H
Glicosídeos	Genistina	C ₆ O ₃ H ₁₁	H	OH
	Daidzina	C ₆ O ₃ H ₁₁	H	H
	Glicitina	C ₆ O ₃ H ₁₁	OCH ₃	H
Acetil glicosídeos	A-Genistina	C ₆ O ₃ H ₁₁ + COCH ₃	H	OH
	A-Daidzina	C ₆ O ₃ H ₁₁ + COCH ₃	H	H
	A-Glicitina	C ₆ O ₃ H ₁₁ + COCH ₃	OCH ₃	H
Malonil glicosídeos	M-Genistina	C ₆ O ₃ H ₁₁ + COCH ₂ COOH	H	OH
	M-Daidzina	C ₆ O ₃ H ₁₁ + COCH ₂ COOH	H	H
	M-Glicitina	C ₆ O ₃ H ₁₁ + COCH ₂ COOH	OCH ₃	H

Figura 2 Classificação e estrutura química das isoflavonas.

Fonte: Kao et al. (2008).

A concentração de isoflavonas na soja varia entre 0,3 a 0,8 % em peso seco e estão presentes na soja principalmente na forma glicosídica (JUNG; MURPHY; SALA, 2008). No entanto, a biodisponibilidade das isoflavonas no corpo humano depende da capacidade das β -glicosidases, da microbiota intestinal, em degradar as formas glicosiladas de isoflavonas para a forma aglicona (LIMA, 2003).

As β -glicosidases (β -D-glucosídeo-*o*-glucohidrolase, EC. 3.2.1.21) são enzimas que hidrolisam as ligações β -glicosídicas dos dissacarídeos, oligossacarídeos e outros glicosídeos conjugados. Estão amplamente distribuídas na natureza e desempenham um papel muito importante nos processos biológicos, como na hidrólise de compostos fenólicos e glicolipídeos e modificações de metabólitos secundários, como os glicosídeos fitoestrogênicos, melhorando sua atividade biológica (HSIEH; GRAHAM, 2001; YANG et al., 2009).

Segundo Kao, Chien e Chen (2008), as formas agliconas possuem maior biodisponibilidade e maior atividade biológica do que as formas conjugadas, no entanto, diversos estudos ainda vêm sendo realizados para verificar a biodisponibilidade das isoflavonas em humanos.

Estudos demonstraram que as isoflavonas apresentam estrutura química e massa molar semelhante aos estrógenos, que são os hormônios sexuais femininos. (ADLERCREUTZ; MAZUR, 1997; ROSTAGNO et al., 2009). Dentre as agliconas, a genisteína tem recebido atenção não só pelo seu potencial efeito anti-estrogênico, mas também por inibir muitas enzimas-chave que podem estar envolvidas no surgimento do câncer (MOLTENI; BRIZIO-MOLTENI; PERSKY, 1995). A Figura 3 ilustra a estrutura molecular do hormônio 17 β -estradiol (a) e da genisteína (b).

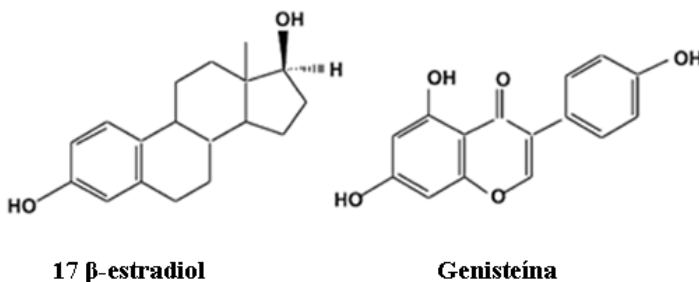


Figura 3 Estrutura molecular do hormônio 17 β -estradiol (a) e da genisteína (b).

Fonte: Boersma et al. (2001).

Dentre os principais efeitos funcionais das isoflavonas tem-se a diminuição da intensidade e frequência dos sintomas vasomotores em mulheres na menopausa (NAHÁS et al., 2003), na prevenção da osteoporose (POTTER; BAUM; TENG, 1998; ESTEVES; MONTEIRO, 2001), na redução de doenças cardiovasculares (LISSIN; COOKE, 2000; SACKS et al., 2006) e na diminuição do colesterol sérico e da pressão arterial (POTTER ; BAUM; TENG, 1998; WEGGEMANS; TRAUTWEIN, 2003; LUKACZER et al., 2006). Estudos também comprovam que essas substâncias possuem atividade antioxidante, antifúngica e antimutagênica (MIYAZAWA et al., 1999; LEE et al., 2005; BENAVENT et al., 2008), além de atuar no metabolismo dos lipídeos e da glicose (CEDERROTH; NEF, 2009). Existem diversos trabalhos apontando os benefícios das isoflavonas para a saúde, porém ainda não foi estabelecida a quantidade necessária de isoflavonas que deve ser ingerida para produzir tais efeitos. Setchell (1998) com base em alguns estudos, propôs que a ingestão diária de 30-50 mg seria o suficiente para desencadear os efeitos clínicos benéficos à saúde.

O teor de isoflavonas em derivados da soja depende da matriz do produto (sólido ou líquido), do processamento e das condições de estocagem (BARNES; KIRK; COWARD, 1994). Os processos tecnológicos utilizados para a obtenção de alimentos derivados da soja podem afetar as características do produto final, inclusive de alguns componentes que definam as suas propriedades funcionais, como as isoflavonas. Sabe-se que a biodisponibilidade das isoflavonas pode ser influenciada pela sua forma química nos alimentos e sua suscetibilidade para degradação durante tratamentos térmicos (CEDERROTH; NEF, 2009). Vários trabalhos têm mostrado que a concentração e o perfil das isoflavonas sofrem alterações em decorrência dos diferentes tratamentos aplicados à soja para a obtenção de diferentes produtos alimentícios. Os tratamentos térmicos e a maceração da soja são considerados os principais fatores nesse aspecto (COWARD et al., 1998; GRÜN et al., 2001; JACKSON et al., 2002; EISEN; UNGAR; SHIMONI, 2003; SHIMONI, 2004; ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2005; MATHIAS et al., 2006; PRABHAKARAN; PERERA, 2006; NUFER; ISMAIL; HAYES, 2009).

Segundo Sutil (2006), o tratamento hidrotérmico dos grãos, prática comum no processamento de diversos alimentos como tempeh, tofu e extrato hidrossolúvel de soja, facilita a clivagem das isoflavonas conjugadas (β -glicosídeos), pela ação das enzimas β -glicosídeses endógenas da soja e, conseqüentemente, aumenta o teor de agliconas.

Durante o processamento, os grãos da soja são submetidos a condições que podem favorecer ou inibir a atuação da enzima β -glicosidase, já que as β -glicosidasas endógenas da soja apresentam sua atividade ótima em temperatura de 50 °C e pH 6,0, porém quando purificadas podem atuar em diferentes faixas de temperatura e pH (MATSUURA; OBATA; HUKUSHIMA, 1989).

A etapa de fermentação no processamento de alguns produtos da soja, como o tofu e o tempeh, também pode alterar o perfil das isoflavonas. O processo fermentativo leva a um aumento do teor de agliconas (genisteína e daidzeína) devido à ação hidrolítica das β -glicosidasas produzidas por determinadas bactérias lácticas utilizadas no processo (ROSSI et al., 2004). Alguns microorganismos probióticos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são conhecidos por possuírem β -glicosidasas endógenas que podem alterar o perfil das isoflavonas durante a fermentação. Embora cada grupo de probióticos tenha potencial hidrolítico distinto em um processo fermentativo, sabe-se que nesse processo aumenta-se a concentração de isoflavonas agliconas bioativas e, concomitantemente, diminui a concentração das isoflavonas glicosídicas (OTIENO; ASHTON; SHAH, 2007).

A quantificação de isoflavonas em produtos da soja é geralmente realizada pela extração destas do grão ou da matriz alimentícia utilizando solventes polares, sendo em seguida o extrato analisado, por exemplo, através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou do imuno-ensaio (BERHOW, 2002)

A etapa de extração é extremamente importante, pois permite a liberação do analito da matriz, possibilitando a determinação quantitativa dos compostos de interesse. Após a adição de solvente orgânico (metanol, etanol ou acetonitrila) ao material, é feita a filtração para obtenção de extratos que serão utilizados na quantificação das isoflavonas por CLAE (VACEK et al., 2008). No entanto, vários parâmetros podem influenciar na etapa de extração das isoflavonas, tais como polaridade e quantidade de solvente, temperatura, massa e tipo de amostra e tempo de extração (ROSTAGNO et al., 2009).

Outros procedimentos mostraram ser fundamentais para melhorar a eficiência do processo de determinação das isoflavonas, como o desengorduramento da amostra com hexano (COWARD et al., 1993) e a filtração do extrato em pré-coluna de fase sólida antes da injeção no cromatógrafo, já que ambos serviriam para eliminação de interferentes, auxiliando na preservação da integridade da coluna cromatográfica (BERHOW, 2002).

As técnicas cromatográficas são as mais empregadas para a separação dos 12 isômeros de isoflavonas de soja e seus derivados, sendo que a CLAE equipada com coluna de fase reversa, em condições de gradiente binário, é a técnica analítica mais utilizada (ROSTAGNO et al., 2009). As metodologias de separação de isoflavonas por CLAE variam muito e podem ser desenvolvidas pelo uso de diferentes condições isocráticas, utilizando apenas um solvente ou sistemas em gradiente binário em coluna de fase reversa, onde a fase estacionária (C_{18}) possui polaridade maior que a fase móvel. A separação das isoflavonas em fase reversa baseia-se nas interações hidrofóbicas dos isômeros das isoflavonas com a fase estacionária e os tempos de retenção de cada um variam de acordo com a afinidade com fase estacionária, composição da fase móvel, aplicação de gradiente de eluição, temperatura da coluna, dentre outros. A hidrofobicidade das isoflavonas aumenta na ordem β -glicosídeos, malonil glicosídeos, acetil glicosídeos e agliconas, que são as mais hidrofóbicas (VACEK et al., 2008).

1.3 Processos de Separação por Membranas (PSM)

Foi a partir da década de 60, do século XX, que os Processos de Separação por Membranas (PSM) surgiram como uma alternativa às operações convencionais de separação, como a destilação e a filtração, contudo o seu desenvolvimento em escala comercial emergiu na década de 80, nos Estados Unidos e na Noruega. A aplicação do PSM foi difundido nas indústrias química (FERSI et al., 2005), farmacêutica (DRIOLI; GIORNO, 1999), alimentícia (NOBLE; STERN, 1995; BAKER, 2004; HABERT; BORGES, NÓBREGA, 2006), na área biotecnológica (CHERYAN, 1998); bem como no tratamento de águas residuais (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006; STEPHENSON et al., 2006), por possuir uma série de vantagens, tais como baixo consumo de energia; redução do número de etapas de processamento; simplicidade de operação; alta seletividade e eficiência na separação; além da obtenção de produtos com maior qualidade por não fazer uso de altas temperaturas, preservando as características nutricionais e sensoriais do produto obtido (STRATHMANN, 1990; CHERYAN, 1998; BAKER, 2004; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2000; ORDÓNEZ, 2005).

Dentre os PSM têm-se a microfiltração, a ultrafiltração, a nanofiltração e a osmose inversa, cujas principais diferenças são

relativas ao tamanho médio dos poros da membrana e, consequentemente à aplicação de diferentes parâmetros de operação, permitindo ou não a passagem de determinados componentes (Figura 4). À medida que o tamanho médio de poro da membrana diminui, torna-se necessário a aplicação de maiores pressões, para permitir a passagem de solução através da membrana, sendo utilizadas faixas entre 0,2 a 3,5 bar, para a microfiltração; 0,5 a 5,0 bar, para a ultrafiltração; 1,5 a 40 bar para a nanofiltração; e de 20 a 100 bar, para a osmose inversa (CHERYAN, 1998).

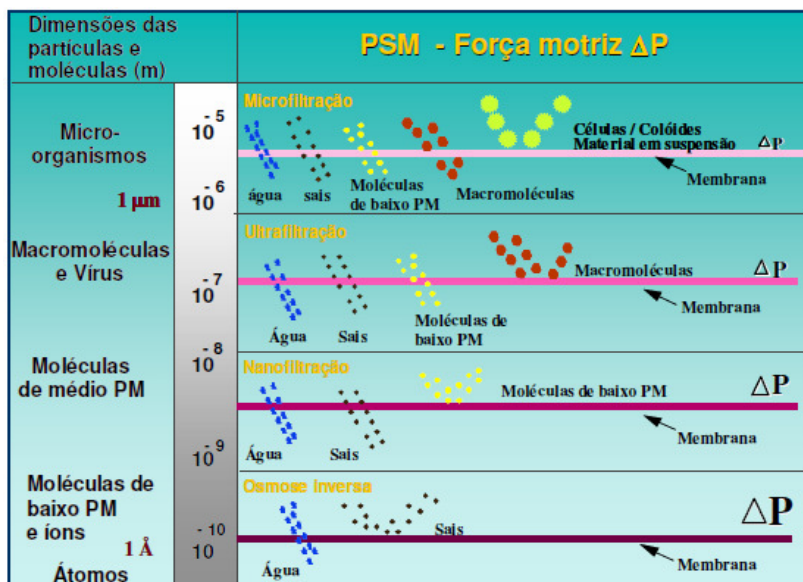


Figura 4 Principais características dos Processos de Separação por Membranas (PSM) de acordo com a seletividade e força motriz aplicada.

Fonte: Habert et al. (2006).

De acordo com Strathmann (1990), as membranas são definidas como filmes poliméricos ou inorgânicos semipermeáveis que servem como uma barreira seletiva para uma filtração em escala molecular de uma solução, quando aplicada alguma força motriz. Esta barreira, que controla a transferência de massa através de sua superfície, permite a passagem de certos componentes de uma solução e restringe a passagem de outros, gerando duas correntes distintas o permeado ou filtrado, que é

o fluido que atravessa a membrana, e o concentrado ou retentado, este constituído dos solutos que não ultrapassam a membrana por apresentarem partículas maiores que o tamanho médio dos poros da mesma (CHERYAN, 1998; ORDÓÑEZ, 2005).

A caracterização das membranas pode ser realizada de acordo com a estrutura morfológica, natureza (material) e configuração modular (CHERYAN, 1998). Quanto à morfologia, as membranas podem ser classificadas em simétricas (isotrópicas) ou assimétricas (anisotrópicas), porosas ou densas. Tanto as membranas densas quanto as porosas podem ser simétricas ou assimétricas, ou seja, podem não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Nas membranas porosas, a seletividade está diretamente associada entre o tamanho do poro da membrana e o tamanho das partículas da solução, que devem ser inertes em relação ao material que constitui a membrana. Nesse caso, o principal mecanismo de transporte é a convecção. Já as membranas densas caracterizam-se por apresentarem apenas uma fase, não possuindo poros em sua estrutura. Nesse caso, o transporte das moléculas através da membrana ocorre nas seguintes etapas: a sorção das moléculas na superfície da membrana, a difusão através do material que constitui a membrana e por último, a dessorção das moléculas no lado do permeado (MULDER, 2000; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

As membranas simétricas são uniformes ao longo de sua estrutura, com densidade constante, podendo ser porosas ou não, apresentando seletividade absoluta, ou seja, retenção de 100 % das partículas com diâmetro maior que o do poro nominal. Já as membranas assimétricas têm um gradiente de composição em sua estrutura, apresentando diferença no tamanho do poro perpendicular à superfície, sendo que os poros normalmente crescem em direção oposta à superfície filtrante. Esse tipo de membrana possui uma fina camada densa de 0,1 a 0,2 μm de espessura que realiza a separação e determina o fluxo; além de uma camada porosa, que dá a sustentação mecânica da membrana. As propriedades de separação de membranas simétricas são determinadas por toda a sua estrutura, enquanto as propriedades de separação de membrana assimétricas são principalmente determinadas pela região mais densa da membrana (DZIEZAK, 1990; CHERYAN, 1998).

Outra importante diferença entre membranas assimétricas e simétricas está na definição e caracterização dos limites de retenção. A retenção das membranas simétricas é dada em função do seu diâmetro equivalente ao poro de máximo tamanho, enquanto que para as

membranas assimétricas essa retenção é expressa como razão nominal que se refere a um diâmetro de corte (*cut off*), definido como o valor da massa molar das moléculas para o qual a membrana apresenta coeficiente de rejeição de 95 % (CHERYAN, 1998; MULDER, 2000; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). Assim, uma membrana com diâmetro de corte nominal de 15 kDa é aquela capaz de rejeitar 95 % de moléculas com massas molares de 15 kDa ou superiores (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

As membranas podem ser fabricadas a partir de uma grande variedade de materiais (PETRUS, 1997; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). As membranas sintéticas comerciais são produzidas a partir de dois grupos de material: os polímeros, que se constituem de materiais orgânicos (acetato de celulose, poliamidas, polissulfonas, polifluoreto de vinilideno, dentre outros); e os materiais inorgânicos (metais e materiais cerâmicos) (HABERT, 2006). Segundo Petrus (1997) e Cheryan (1998), as membranas poliméricas apresentam altos fluxos, boa rejeição a sais, tolerância a altas temperaturas (até 75 °C) e a variações de pH (2 a 12), boa resistência ao cloro (até 200 mL/L) e à compactação. Já as membranas inorgânicas ou cerâmicas possuem grande resistência mecânica e suportam altas pressões (20 bar). Além disso, toleram todas as faixas de pH (0 a 14) e temperaturas superiores a 400 °C; são quimicamente inertes, porém têm custo mais elevado (CUPERUS; NIJHUIS, 1993).

As membranas industriais são dispostas em módulos, que permitem acomodar grandes áreas de filtração em um pequeno espaço, cujas estruturas suportam a pressão aplicada sobre o sistema. Segundo Barato (2008), os módulos devem apresentar canais para alimentação e para a remoção do permeado e do concentrado. Os módulos podem ser preparados tanto na geometria plana (placa-quadro e espiral) quanto cilíndrica (tubular, capilar e fibra oca) (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006) (Figura 5). Essas configurações são as estruturas que dão suporte e condicionam a membrana e, segundo Rautenbach e Albrecht (1989), devem atender às características de interesse, tais como alta área de permeação por volume ocupado, baixo custo de fabricação, facilidade de operação e limpeza, além da possibilidade e facilidade de troca da membrana. Dentre estes módulos, o espiral é constituído de várias camadas de membranas planas, suporte e espaçadores enrolados em um tubo coletor de permeado. É o módulo mais compacto que atualmente existem no mercado, destacando-se por apresentar alta relação área/volume e baixo custo de fabricação (STRATHMANN, 1990).

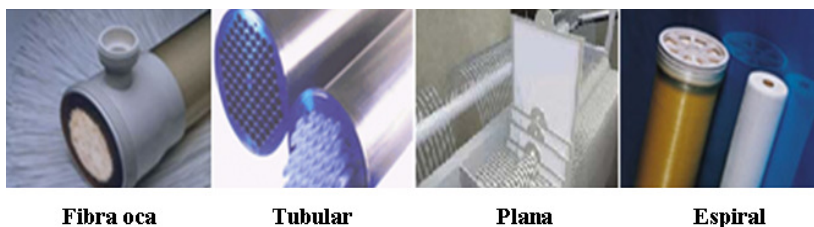


Figura 5 Principais configurações de módulos de membranas.

Fonte: Gea Filtration (2009).

Existem dois métodos de filtração utilizados no processo de separação por membranas: a filtração convencional ou perpendicular (*dead-end filtration*) e a filtração tangencial (*cross-flow filtration*) (CHERYAN, 1998) (Figura 6). Em um sistema de filtração convencional, o escoamento do fluido ocorre perpendicularmente à superfície da membrana, fazendo com que os solutos se depositem sobre a mesma, favorecendo a formação da camada de polarização (MULDER, 2000), resultando na diminuição do fluxo de permeado, tornando necessárias interrupções do processo para limpeza da membrana (PAULSON; WILSON; SPATZ, 1984). Dessa forma, essa configuração é viável somente com suspensões que contenham baixo teor de sólidos, sendo usadas na separação de partículas imiscíveis, maiores que $10\ \mu\text{m}$ (DZIEZAK, 1990). Já na filtração tangencial, o fluido escoia paralelamente à superfície da membrana enquanto o permeado é transportado transversalmente à mesma ocorrendo o arraste contínuo dos solutos, que tendem a se acumular na superfície, permitindo manter o fluxo e tornando o processo mais eficiente (PAULSON; WILSON; SPATZ, 1984; MULDER, 2000; BAKER, 2004; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). Dessa forma a filtração tangencial permite concentrar soluções com maiores teores de sólidos totais (RAUTENBACH; ALBRECHT, 1989), além de ser viável ao emprego de maior volume de matéria-prima, gerando processos contínuos (DZIEZAK, 1990).

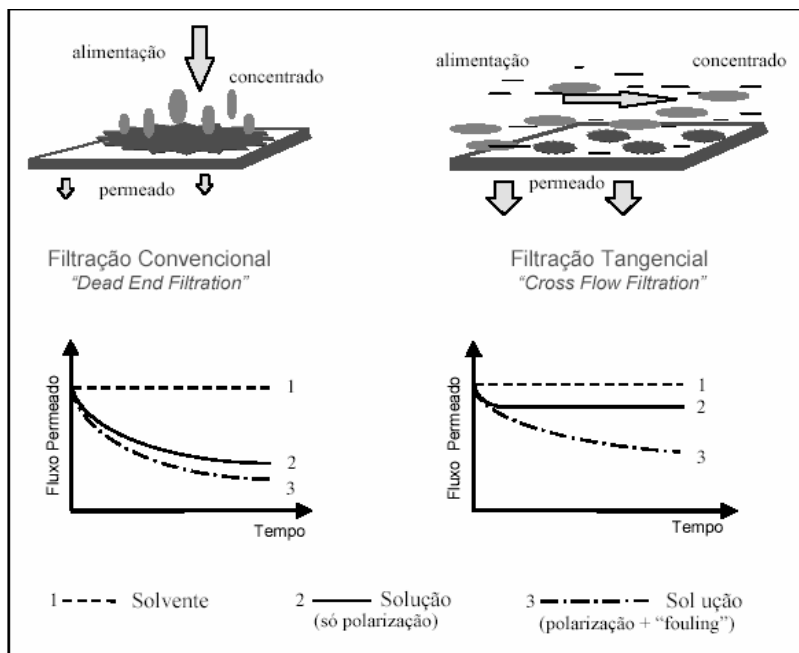


Figura 6 Comparação entre o processo de filtração perpendicular (convencional) e a filtração tangencial e respectivos comportamentos de fluxo em função do tempo.

Fonte: Nascimento (2004).

Nos processos de separação por membranas, normalmente ocorre um declínio do fluxo de permeado com o tempo. Esse declínio geralmente é resultado de alguns fenômenos decorrentes do processo, tais como a camada de polarização, formação da camada gel polarizada e efeito *fouling*, sendo este o entupimento dos poros da membrana (CHERYAN, 1998; MIRANDA, 2005). De acordo com Schäfer, Fane e Waite (2006), a camada de polarização é um fenômeno reversível ocasionado pelo acúmulo de solutos na superfície da membrana, aumentando sua concentração ao longo do tempo do processo. Esse fenômeno pode ser definido pelo gradiente de concentração formado entre a região próxima à membrana (camada limite), com alta concentração de solutos e a região por onde passa a solução de alimentação (Figura 7). Esse gradiente formado é compensado por uma difusão desses solutos no sentido contrário ao fluxo de permeado,

formando a zona de polarização e, consequentemente, provocando uma diminuição do fluxo (SCHÄFER; FANE; WAITE, 2006). Já o *fouling*, é um fenômeno irreversível, caracterizado pela deposição e acúmulo de solutos na superfície e dentro dos poros da membrana, por adsorção ou bloqueio físico dos poros. A intensidade do *fouling* depende do tipo de membrana, da concentração e solutos presentes na solução, bem como da temperatura, pH e tempo de operação. Como o *fouling* ocorre devido a interações físicas e químicas entre os solutos e a membrana, não pode ser minimizado apenas por modificações das condições hidrodinâmicas do sistema, sendo necessária a aplicação de processos de limpeza, com substâncias detergentes, soluções alcalinas e ácidas ou agentes oxidantes, recomendados a cada tipo de membrana (PETRUS, 1997; RODRIGUES, 2002).

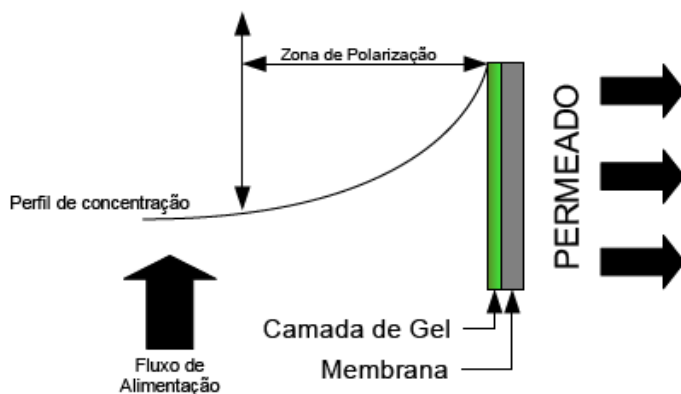


Figura 7 Esquema de formação da camada gel na membrana.

Fonte: Adaptado de Petrus (1997).

Os PSM vêm sendo empregados no processamento de produtos da soja visando à concentração e/ou fracionamento de sólidos, resultando em maior rendimento e qualidade nutricional de produtos (RAZAVI; HARRIS, 1996b; KUBERKAR; DAVIS, 2000; NOORDMAN et al., 2003; KUMAR; YEA; CHERYAN, 2004), sendo que a ultrafiltração é o processo mais utilizado para fracionamento e/ou concentração de proteínas (ALIBHAI et al., 2006; MOURE; DOMÍNGUES; PARAJO, 2006) e de isoflavonas (XU et al., 2004). Paralelamente a isso, vem sendo estudadas as melhores condições operacionais e tipos de membranas, onde a preocupação é relativa à

diminuição do *fouling* e à viabilidade econômica para aplicação desta tecnologia em escala industrial (RAZAVI; HARRIS, 1996a; NOORDMAN et al., 2003; KUMAR; YEA; CHERYAN, 2004; MARCOS et al., 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-estrogens and Western diseases. **Annals of Medicine**, v.29, p.95-120, 1997.

ALIBHAI, Z.; MONDOR, M.; MORESOLI, C.; IPPERSIEL, D.; LAMARCHE, F. Production of soy protein concentrates/isolates: traditional and membrane technologies. **Desalination**, v.191, p.351-358, 2006.

ALVES, R.C.; ALMEIDA, I.M.C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Method development and validation for isoflavones quantification in coffee. **Food Chemistry** (on line), 2010.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, 2004. 568 p.

BARATO, N.C. **Clarificação de Suco de Caju Através de Separação por Membranas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

BARBOSA, M. Z.; ASSUMPÇÃO, R. Ocupação territorial da produção e da agroindústria da soja no Brasil, nas décadas de 80 e 90. **Informações Econômicas**, v.31, n.11, p.7-16, 2001.

BARBOSA, A.C.L.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M. I. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. **Food Chemistry**, v.98, p.757-766, 2006.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.2466-2474, 1994.

BARNES, S.; PRASAIN, J.; D'ALESSANDRO, T.; WANG, C.C.; ZHANG, H.; KIM, H. Soy Isoflavones. In: HEBER, D.; BLACKBURN, G.; GO, V.; MILNER, J. **Nutritional Oncology**. San Diego: Elsevier, 2006. V.2, Cap.32, p.559-571.

BAZINET, L.; LAMARCHE, R.; TOUPIN, R.; BOULET, M.; IPPERSIELL, D. Electroacidification of soybean for production of isolate. **Food Technology**, v.51, n.9, p.52-60, 1997.

BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A.A.P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.431-439, 2004.

BENAVENT, M.A.; SILVÁN, J.M.; MORENO, F.J.; VILLAMIEL, M.; CASTILLO, M. D. Protein quality, antigenicity, and antioxidant activity of soy-based foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.15, p. 6948-6505, 2008.

BERHOW, M.A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B.S.; MANTHEY, J.A. **Flavonoids in the living cell**. New York: Klusher, 2002. 505 p.

BOERSMA, B.J.; BARNES, S.; KIRK, M.; WANG, C. C.; SMITH, M.; KIM, H.; XU, J.; PATEL, R.; USMAR, V.M. Soy isoflavonoids and cancer- metabolism at the target site. **Mutation Research** , v.480, p.121-127, 2001.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SIMÃO, A.S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.8, p.897-902, 2003.

CASSINI, A.S.; TESSARO, I.C.; MARCZAK, L.D.F.; PERTILE, C. Ultrafiltration of wastewater from isolated soy protein production: a comparison of three UF membranes. **Journal of Cleaner Production**, v.18, p.260-265, 2010.

CEDERROTH, C.R.; NEF, S. Soy, isoflavones and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.304, n.1, p.30-42, 2009.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1998. 527p.

CHOI, M.S.; RHEE, K.C. Production and Processing of soybeans and nutrition and safety of isoflavone and other soy products for human health. **Journal of Medicinal Food**. v.9, n.1, p.1-10, 2006.

CHUN, J.; KIM, J.S.; KIM, J.H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. **Food Chemistry**, v.109, p.278-284, 2008.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamento de Avaliação da safra 2007/2008**. 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 15 fevereiro 2009.

COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1961-1967, 1993.

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1486-1491, 1998.

CUPERUS, F.P.; NIJHUIS, H.H. Applications of membrane technology to food processing. **Food Science and Technology**, v.7, p.277-282, 1993.

DEVI, M.K.A.; GONDI, M.; SAKTHIVELU, G.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISSHANKAR, G.A. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.114, p.771-776, 2008.

DRIOLI, E.; GIORNO, L. **Biocatalytic Membrane Reactors: Applications in Biotechnology and the Pharmaceutical Industry**. Filadélfia, EUA: Taylor e Francis Ltda, 1999. 211 p.

DZIEZAK, J. D. Membrane separation technology offers processors unlimited potential. **Food Technology**, v.44, n.9, p. 108-113, 1990.

EISEN, B.; UNGAR, Y.; SHIMONI, E. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2212-2215, 2003.

EMBRAPA SOJA. **A soja no Brasil**. 2008. Disponível em:
<<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>.
Acesso em: 15 fevereiro 2009.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v.14, n.1, p.43-52, 2001.

FERSI, C.; GZARA, L.; DHAHBI, M. Treatment of textile effluents by membrane technologies. **Desalination**, v.185, p.399-409, 2005.

GEA FILTRATION. **Tipos de membranas**. 2009. Disponível em:
<http://www.geafiltration.com/Portuguese/Tecnologia/Tipos_de_Membranas.htm>. Acesso em: 20 julho 2009.

GRÜN, I.U.; ADHIKARI, K.; LI, C.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J.; FERNANDO, L.N. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, n.6, p. 2839-2843, 2001.

HABERT A.C.; BORGES C.P.; NÓBREGA R. **Processos de Separação com Membranas. Programa de engenharia química/ COPPE/ UFRJ**, 2000.

HABERT, A., C; BORGES, C.P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. 180p.

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v.58, p. 995-1005, 2001.

JACKSON, C.J.C.; DINI, J.P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H.P.V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZEL, D.; DEGRANDIS, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v.37, p.1117-1123, 2002.

JUNG, S.; MURPHY, P.A.; SALA, I. Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. **Food Chemistry**, v.111, p.592-598, 2008.

KAO, T.H.; CHIEN, J.T.; CHEN, B.H. Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v.107, p.1728-1736, 2008.

KIM, J.K.; KIM, S.H.; HAHN, S.J.; CHUNG, M. Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. **Food Research International**, v.38, p.435-444, 2005.

KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. **Iowa State Journal of Research**, v.60, n.4, p.501-527, 1986.

KUBERKAR, V.T.; DAVIS, R.H. Modeling of fouling reduction by secondary membranes. **Journal of Membrane Science**, v.168, p.243-258, 2000.

KUMAR, N.S.K.; YEA, M.K.; CHERYAN, M. Ultrafiltration of soy protein concentrate: performance and modelling of spiral and tubular polymeric modules. **Journal of Membrane Science**, v.244, p.235-242, 2004.

LEE, S.J.; YAN, W.; AHN, J.K.; CHUNG, I.M. Effects of year, genotype and their interactions on various soybeans isoflavones. **Field Crops Research**, v.81, p.181-192, 2003.

LEE, C.H.; YANG, L.; XU, J.Z.; YEUNG, S.Y, V.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chemistry**, v.90, p.735-741, 2005.

LEE, S.J.; AHN, J.K.; KHANH, T.D.; CHUN, S.C.; KIM, S.L.; RO, H.M.; SONG, H.K.; CHUNG, I.L. Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.23, p.9415-9421, 2007.

LI-JUN, Y.; LI-TE, L.; ZAI-GUI, L.; TATSUMI, E.; SAITO, M. Changes in isoflavone contents and composition of sufu (fermented tofu) during manufacturing. **Food Chemistry**, v.87, p.587-592, 2004.

LIMA, A. F. **Produção e Caracterização de β -glicosidase Vegetal e Microbiana e sua Aplicação para Conversão de Isoflavonas Glicosiladas em Isoflavonas Agliconas**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

LISSIN, L.W.; COOKE, J.P. Review article: phytoestrogens and cardiovascular health, **Journal of the American College of Cardiology**, v.35, n.6, p.1403-1410, 2000.

LUKACZER, D.; LISKA, D.J.; LERMAN, R.H.; DARLAND, G.; SCHILTZ, B.; TRIPP, M.; BLAND, J.S. Effect of a low glycemic index diet with soy protein and phytosterols on CVD risk factors in postmenopausal women. **Nutrition**, v.22, p.104-113, 2006.

MAKELA, S.I.; PYLKKÄNEN, L.H.; SANTTI, R.S.S.; ADLERCREUTZ, A. Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. **The Journal of Nutrition**, p.436-445, 1994.

MARCOS, B.; MORESOLI, C.; SKOREPOVAB, J.; VAUGHAN, B. CFD modeling of a transient hollow fiber ultrafiltration system for protein concentration. **Journal of Membrane Science**, v.337, p.136-144, 2009.

MATHIAS, K.; ISMAIL, B.; CORVALAN, C.M.; HAYES, K.D. Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.54, n.20, p.7495-7502, 2006.

MATSUURA, M.; OBATA, A.; HUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. **Journal of Food Science**, v.54, n.3, p.602-605, 1989.

MIRANDA, K. F. **Estudo da Voncentração de Licopeno por Ultrafiltração a partir de Suco de Melancia (*Citrullus vulgaris* Schard)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

MIYAZAWA, M.; SAKANO, K.; NAKAMURA, S.; KOSAKA, H. Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.4, p.1346-1349, 1999.

MOLTENI, A.; BRIZIO-MOLTENI, L.; PERSKY, V. *In vitro* hormonal effects of soybean isoflavones. **Journal of Nutrition**, v.125, p.751-756, 1995.

MORAES, R. M. A.; JOSE, I. C.; RAMOS, F. G.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.725-729, 2006.

MOURE, A.; DOMÍNGUES, H.; PARAJO, J.C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**, v.41, p.447-456, 2006.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology, center for membrane science and technology**, University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2000. 564p.

NAHÁS, E. A. P.; NETO J. N.; LUCA, L.A.; TRAIMAN, P.; PONTES, A.; SALBEN, I. Efeitos da isoflavona sobre os sintomas climatéricos e o perfil lipídico na mulher em menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, n.5, p.337-343, 2003.

NASCIMENTO, J.F. **Avaliação de Membranas de Osmose Inversa no Tratamento de Águas de Purga de Torres de Refrigeração de Indústria Petrolífera com Finalidade de Reuso**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química. UFF, Niterói.

NOBEL, R.D.; STERN, S.A. **Membrane Separations Technology, Principles and Applications**. The Netherlands: Elsevier, 1995. 718 p.

NOORDMAN, T.R.; KOOIKER, K.; BEL, W.; DEKKER, M.; WESSELINGH, J.A. Concentration of aqueous extracts of defatted soy flour by ultrafiltration: Effect of suspended particles on the filtration flux. **Journal of Food Engineering**, v.58, p.135-141, 2003.

NUFER, K.R.; ISMAIL, B.; HAYES, K.D. The effects of processing and extraction conditions on content, profile, and stability of isoflavones in a soymilk system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, n.4, p.1213-1218, 2009.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de alimentos – Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, v.1, 2005.

OTIENO, D.O.; ASHTON, J.F.; SHAH, N.P. Isoflavone phytoestrogen degradation in fermented soymilk with selected β -glucosidase producing *L. acidophilus* strains during storage at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.79-88, 2007.

PARK, H.; CHOI, T.B.; KIM, S.W.; HUR, M.G.; YANG, S.D.; YU, K.H. A study on effective extraction of isoflavones from soy germ using the electronbeam. **Radiation Physics and Chemistry**, v.78, p.623-625, 2009.

PAULSON, D. J; WILSON, R. L; SPATZ, D. D. Crossflow membrane technology and its applications. **Food technology**, v.38, n.12, p.77-87, 1984.

PENALVO, J.L.; CASTILHO, M.C.; SILVEIRA, M, I, N; MATAALLANA.; M, C.; TORIJA, M,E. Fatty acid profile of traditional soymilk. **European Food Research. and Technology**. v.219, n.3, p. 251-253, 2004.

PETRUS, J.C.C. **Preparação, Modificação e Caracterização de Membranas Assimétricas para Clarificação de Sucos de Frutas**. 1997. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.16, n.1, p.179-187, 2006.

POTTER, S.M., BAUM, J.A., TENG, H. Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, n.6, p.1375S-1379S, 1998.

PRABHAKARAN, M. P.; PERERA, C.O. Effect of extraction methods and UHT treatment conditions on the level of isoflavones during soymilk manufacture. **Food Chemistry**, v.99, p.231-237, 2006.

PUPPO, M. C.; AÑÓN, M. C. Soybean protein dispersions at acid pH. Thermal and rheological properties. **Journal of Food Science**, v.64, n.1, p.50-56, 1999.

RAUTENBACH, R; ALBRECHT, R. **Membrane Processes**. Chichester: John Wiley & Sons, 1989. 359p.

RAZAVI, S.K.S.; HARRIS, J.L.; SHERKAT, F. Fouling and cleaning of membranes in the ultrafiltration of the aqueous extract of soy flour. **Journal of Membrane Science**, v.114, p.93-104, 1996a.

RAZAVI, S.K.S.; HARRIS, J.L. Shear controlled model of the ultrafiltration of soy suspensions. **Journal of Membrane Science**, v.118, p.279-288, 1996b.

RODRIGUES, R.B. **Aplicação dos Processos de Separação por Membranas para Produção de Suco Clarificado e Concentrado de Camu Camu (*Myrciaria dubia*)**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

ROSSI, E.A.; ROSIER, I.; DÂMASO, A.R.; CARLOS, I.Z.; VENDRAMINI, R.C.; ABDALLA, D. S.O.; TALARICO, V.H.; MINTO, D.F. Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja”. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.15, n.2, p.93-99, 2004.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Analytical, nutritional and clinical methods short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects. **Food Chemistry**, v.93, p.557-564, 2005.

ROSTAGNO, M. A.; VILLARESA, A.; GUILLAMÓNA, E.; GARCÍA-LAFUENTEA, A.; MARTÍNEZA, J.A. Review: Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography**, v.1216, n.1, p.2-29, 2009.

SACKS, F.M.; LICHTENSTEIN, A.; HORN, L.V.; HARRIS, W.; ETHERTON, P. K.; WINSTON, M. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. **Journal of the American Heart Association**, v.113, n.7, p.1034-1044, 2006.

SAIDU, J. E. P. **Development, evaluation and characterization of protein-isoflavone enriched soymilk**. 2005. Dissertação. Louisiana State University, Louisiana, Estados Unidos.

SCHÄFER, A.I.; FANE, A.G; WAITE, T.D. **Nanofiltration: Principles and Applications**. Great Britain: Elsevier, 2006. 560 p.

SEGUIN, P.; BODO, R.; AL-TAWAHA, A.M. Soybean isoflavones: factors affecting concentrations in seeds. In: ACHARYA, S.N.; THOMAS, J.E. (Eds.). **Advances in Medicinal Plant Research**. Trivandrum: Research Signpost, 2007. p.65-80.

SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.68, p.1333-1346, 1998.

SGARBIERI, V. C.; GARRUTI, E. C.; GUZMÁN, E. C. Soybeans as an extender of common beans. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, n.3, p.522-526, 1981.

SHIMONI, E. Stability and shelf life of bioactive compounds during food processing and storage: soy isoflavones. **Journal of Food Science**, v.69, n.6, p.160-166, 2004.

STEPHENSON, T.; BRINDLE, K.; JUDD, S.; JEFFERSON, B. **Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment**. Londres: IWA Publishing, 2006. 192 p.

STRATHMANN, H. Synthetic membranes and their preparation. In: PORTER, M.C. **Handbook of Industrial Membrane Technology**. Nova Jersey: Noyes Publications, 1990. 624 p.

SUTIL, G. **Tratamento Hidrotérmico e Ação da Enzima β -glicosidase na Formação de Agliconas em Soja**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.1184-1192, 1995.

USB- United Soybean Board. **The Healthful Balances Nutrient, Soy and Health**. 2008. Disponível em: <<http://www.soyconnection.com/>>. Acesso em: 18 março 2009.

VACEK, J.; KLEJDUS, B.; LOJKOVÁ, L.; KUBÁN, V. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. **Journal of Separation Science**, V.31, P.2054-2067, 2008.

WANG, H.; MURPHY, P. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.8, p.1666-1673, 1994.

WEGGEMANS, R.M.; TRAUTWEIN, E.A. Relation between soy-associated isoflavones and LDL and HDL cholesterol concentrations in humans: a meta-analysis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p. 940–946, 2003.

WILCOX, J.R.; SHIBLES, R.M. Interrelationships among seed quality attributes in soybean. **Crop Science**, v.41, p.11-14, 2001.

XU, L.; LAMB, K.; LAYTON, L.; KUMAR, A. A membrane-based process for recovering isoflavones from a waste stream of soy processing. **Food Research International**, v.37, p.867-874, 2004.

YANG, S.; WANG, L.; YAN, Q.; JIANG, Z.; LI, L. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. **Food Chemistry**, v.115, n.4, p.1247-1252, 2009.

CAPÍTULO 2

Concentração de isoflavonas da soja por nanofiltração

RESUMO

A nanofiltração foi empregada para a obtenção de um concentrado a partir do extrato aquoso de Farinha Desengordurada de Soja (FDS). Foram determinadas as propriedades físicas e químicas deste concentrado, além do perfil e o teor de isoflavonas. Quando comparado ao extrato aquoso original, o concentrado apresentou maiores teores de sólidos totais ($p < 0,05$), e, portanto maiores teores ($p < 0,05$) de cinzas, proteínas e carboidratos. Ocorreu aumento nos teores de isoflavonas totais ($p < 0,05$) no concentrado, entretanto, não foram proporcionais ao aumento do Fator de Redução Volumétrico ($FRV = 4$) utilizado. Observou-se, também, que os teores dos conjugados glicosídicos foram maiores ($p < 0,05$) no concentrado, entretanto não houve diferença ($p > 0,05$) entre os teores de agliconas no extrato aquoso original e no concentrado. Em ambos, extrato aquoso original e concentrado não foi detectada a forma acetil glicosídeos. Finalmente, verificou-se, baseando-se no perfil e nos teores de isoflavonas no concentrado, que a nanofiltração pode ser empregada na concentração destes compostos.

Palavras-Chave: isoflavonas, nanofiltração, concentrado.

ABSTRACT

Nanofiltration was used to obtain a concentrate from the aqueous extract of Defatted Soy Flour (DSF). The chemical and physical properties and also the profile and the isoflavones content in concentrate were determined. When compared to the original aqueous extract, the concentrate had higher total solids ($p < 0.05$), and therefore higher levels ($p < 0.05$) of ashes, protein and carbohydrates. There was an increase in level of total isoflavones ($p < 0.05$) in the concentrate, although it was not proportional to the increase in Volumetric Reduction Factor (VRF = 4) employed. It was noted also that the levels of conjugated glycosides were higher ($p < 0.05$) in the concentrate, however there was no difference ($p > 0.05$) between the levels of aglycones in the original aqueous extract and concentrate. In both the original and the concentrated aqueous extract it was not detected the acetyl glucosides form. Finally, according to the profile and content of isoflavones in the concentrate, the nanofiltration could be used to concentrate these compounds.

Keywords: isoflavones, nanofiltration, concentrate.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max Merril*) é um dos produtos agrícolas que vem despertando interesse nos últimos anos não só pela importância econômica, mas principalmente por suas propriedades nutricionais e funcionais (MACHADO et al., 2008; PAUCAR-MENACHO et al., 2010). Além de ser excelente fonte de proteínas, de ácidos graxos poli-insaturados, minerais e outros nutrientes importantes (SILVA et al., 2006), a soja é conhecida por conter grande número de fitoquímicos bioativos como as isoflavonas, saponinas, fitoesteróis, inibidores de protease, inositol, hexafosfatos, esfingolipídeos, ácidos fenólicos e inibidores de tripsina (PARK et al., 2002; LUTHRIA et al., 2007; WU; MUIR, 2009). Entre esses compostos, as isoflavonas, pertencentes à classe dos fitoestógenos (ADLERCREUTZ; MAZUR, 1997; UMPHRESS et al., 2005; LEE; LEE, 2009), se destacam por sua propriedade funcional (MAHUNGU et al., 1999; RIAZ, 1999; TSUMURA et al., 2005; GÓES-FAVONI; CARRÃO-PANIZZII; BELEIA, 2010). As isoflavonas encontradas na soja podem estar presentes nas seguintes formas químicas: malonil glicosídeos (malonil ginestina, malonil dadizina e malonil glicitina); β -glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina); acetil glicosídeos; e as agliconas, como genisteína, daidzeína e gliciteína (FARAJ; VASANTHAN, 2004; GENOVESE et al., 2007; RANILLA; GENOVESE; LAJOLO, 2009). Estas formas têm sido largamente estudadas quanto aos seus efeitos biológicos benéficos à saúde humana, como atividade estrogênica, antioxidante e antifúngica, atuando na prevenção de doenças do coração, obesidade, hipercolesterolemia, câncer, diabetes, doenças dos rins, osteoporose e sintomas de menopausa (ADLEREREUTZ; MAZUR, 1997; SETCHELL; CASSIDY, 1999; BARNES et al., 2006; CRAIG, 2009).

O potencial da soja como alimento funcional vem sendo explorado pelas indústrias alimentícias através de tecnologias de concentração. Entretanto, estas metodologias utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos (CHANG, 2002). Os processos de separação por membranas, como a nanofiltração, são considerados promissores na concentração de compostos de interesse, porque apresentam vantagens como o uso de baixas temperaturas; baixo consumo de energia; redução do impacto ambiental, devido à eliminação do uso de solventes; além da manutenção das propriedades creditadas a estes compostos (XU et al., 2004; MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010). Estas vantagens são importantes para as isoflavonas, pois

segundo Góes-Favoni et al. (2004) a presença e a concentração destes compostos em produtos da soja são influenciadas pelas condições de processamento, como a temperatura.

A nanofiltração tem hoje várias aplicações importantes (WANG et al., 2009), como na concentração e purificação de compostos presentes em baixas concentrações em plantas e extratos, como xantofilas (TSUI; CHERYAN, 2007), flavonóides, terpenóides (XU; WANG, 2005) e compostos fenólicos (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010), todos de grande aplicação na indústria farmacêutica e química. Entretanto, é recomendável que o produto submetido à nanofiltração tenha baixos teores lipídicos, evitando-se problemas relacionados ao *fouling* da membrana (CUARTAS-URIBE et al., 2007). Estes cuidados foram observados por Noordman et al. (2003) na concentração de compostos funcionais, obtidos a partir de extrato aquoso de farinha de soja. O objetivo deste trabalho foi empregar a nanofiltração visando obter um concentrado, com alto teor de isoflavonas, proveniente de um extrato aquoso de farinha desengordurada de soja, determinando além das suas propriedades físicas e químicas, o perfil e o teor de isoflavonas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A soja utilizada no preparo da farinha desengordurada de soja foi fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa da Soja (Embrapa Soja). Utilizaram-se grãos da linhagem BRS 216, safra 2007, colhidos na região de Mauá da Serra - PR (Latitude sul 23°54', a 1020 m de altitude). A soja, de acordo com informação fornecida pela Embrapa Soja, continha a seguinte composição química: 39,6 % de proteínas, 16,4 % de lipídeos e 90,5 % de sólidos totais.

Os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e grau cromatográfico. Os padrões referentes à daidzina e daidzeína foram obtidos da Fujicco Co., Ltda (Tóquio, Japão), enquanto genistina e genisteína da Sigma Chemicals Co., Ltda (St Louis, MO, EUA.), e a glicitina, gliciteína, malonil daidzina, malonil genistina, malonil glicitina, acetil daidzina, acetil genistina e acetil glicitina da Wako Chemicals (Anaheim, CA, EUA).

2.2 Obtenção do extrato aquoso da farinha desengordurada de soja (FDS)

Para a elaboração do extrato aquoso de FDS (Figura 1), procedeu-se à secagem dos grãos de soja, da cultivar BRS 216, em estufa com circulação de ar forçada (Modelo 32O-SE, FANEM[®], São Paulo, Brasil), a 40 °C por 24 horas. Após a secagem, os grãos foram moídos em moinho de facas (VIBRAMATT[®], São Paulo, SP, Brasil). A farinha obtida nesta etapa foi peneirada em tamiz de 20 mesh e, posteriormente, em tamiz de 35 mesh (GRANUTEST[®], São Paulo, Brasil) e desengordurada com *n*-hexano à temperatura ambiente, em torno de 25 °C.

A FDS foi misturada em água, na proporção de 1:8 (FDS:água) e mantida a 50 °C por 15 horas com agitação de 120 rpm, em *shaker* com agitação orbital (Modelo TE-421, TECNAL[®], Piracicaba, SP, Brasil). Uma agitação adicional foi realizada em agitador magnético (Modelo Q-261, QUIMIS[®], Diadema, SP, Brasil) por 5 minutos. Esta mistura foi submetida a duas etapas de filtração, sendo a primeira realizada em filtro de nylon (BRASHOLANDA[®], Pinhais, PR, Brasil), visando à retirada das partículas maiores da farinha, e a segunda em filtro a vácuo em tela de poliamida com abertura de 7 µm (TEGAPE[®], Curitiba, PR Brasil), obtendo-se então o extrato aquoso de FDS.

2.3 Nanofiltração do extrato aquoso de FDS

Os ensaios da nanofiltração do extrato aquoso de FDS foram realizados em duplicata em uma unidade operando com fluxo tangencial (Figura 2), à temperatura de 16 ± 2 °C e pressão transmembrana de 7 bar. Utilizou-se uma membrana orgânica de polifluoreto de vinilideno com ponto molar de corte de 150-300 g/mol e área filtrante útil de 0,9 m² (Modelo HL2521TF, GE Osmonics[®], Filadélfia, EUA).

Dez litros de extrato aquoso de FDS foram submetidos à NF por aproximadamente 40 minutos, sendo este o tempo necessário para concluir a operação de concentração em um sistema sem reciclo de permeado, atingindo um Fator de Redução Volumétrico (FRV) igual a 4. O FRV foi calculado através da razão entre o volume inicial de extrato de FDS utilizado na alimentação (L) e o volume final de concentrado após a NF (L). Durante a NF foi medido o fluxo do permeado (J) (L.h⁻¹.m⁻²), a cada cinco minutos e calculado de acordo com a Equação 1.

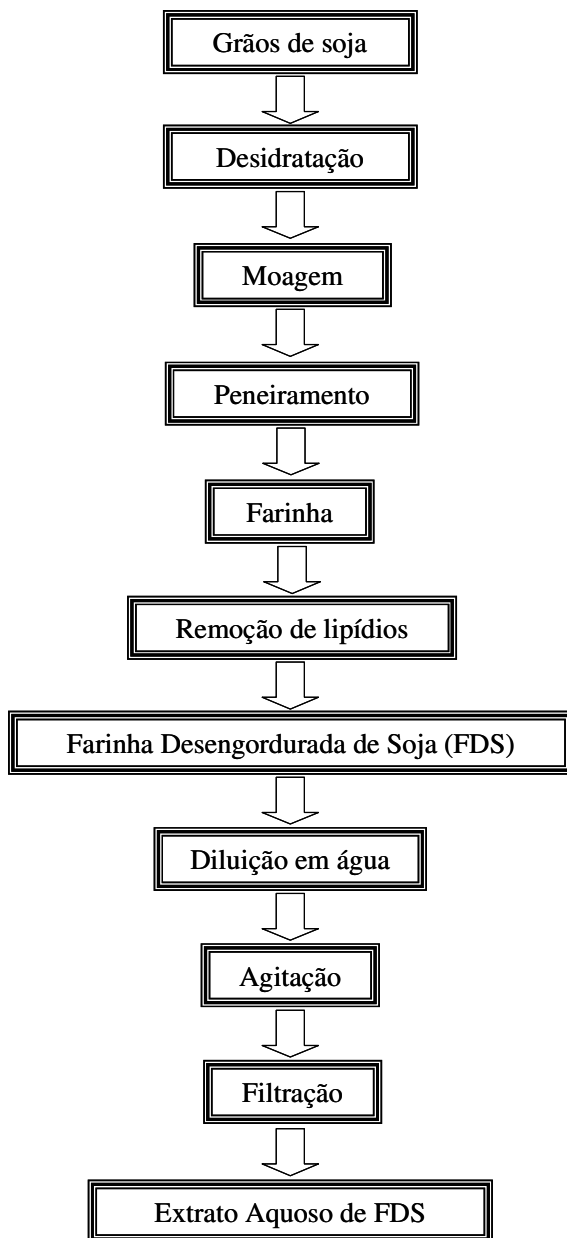


Figura 1 Fluxograma das etapas de obtenção do extrato aquoso da Farinha Desengordurada de Soja (FDS).

$$J = \frac{V_p}{t \times A_p} \quad (\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}) \quad \text{Equação 1}$$

onde V_p (L) é o volume de permeado coletado durante o intervalo de tempo t (h) e A_p (m^2) é a área da superfície de permeação da membrana.

Após cada experimento o equipamento foi higienizado com solução alcalina, de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante.

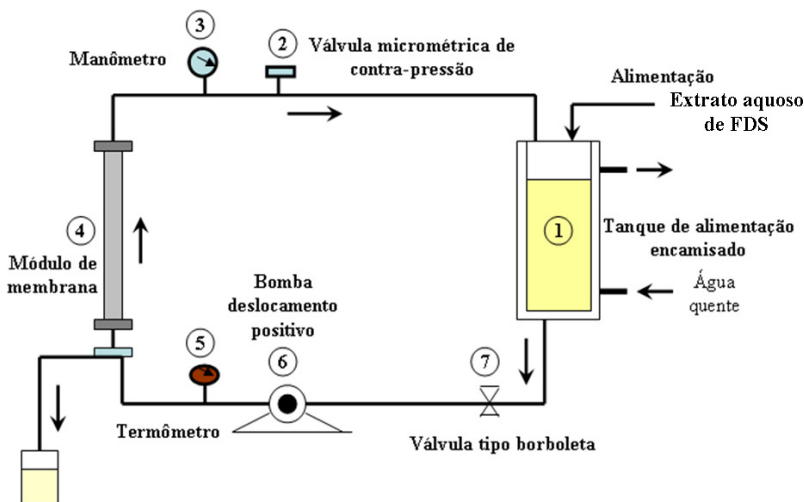


Figura 2 Esquema simplificado da unidade piloto de nanofiltração utilizado nos experimentos.

Fonte: Arquivo pessoal do autor (2010).

2.4 Análise físico-química

Amostras de FDS foram avaliadas quanto aos teores de umidade (% m/m), enquanto as amostras do extrato aquoso de FDS e do concentrado foram avaliadas quanto aos teores de Sólidos Totais (ST) (% m/m), por gravimetria, através de secagem direta em estufa a 105 °C, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Nestas amostras foram determinados os teores de lipídeos (% m/m), por extração em Soxhlet; e o teor de cinzas (% m/m), gravimetricamente, também conforme o IAL (2005). O teor de proteínas (% m/m) foi determinado pelo método Kjeldahl ($N \times 6,25$), segundo metodologia proposta pela AOAC (2005). Já o teor de fibras totais,

realizada também de acordo com a AOAC (2005), foi determinado somente na FDS. Em todas as amostras o teor de carboidratos totais (% m/m) foi obtido por diferença.

O pH do extrato aquoso de FDS foi medido em pHmetro digital (MP220, Metler-Toledo®, Greifensee, Suíça). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Índice de sedimentação (IS)

O Índice de Sedimentação (IS) (%) do extrato de FDS, determinado em triplicata, foi avaliado conforme metodologia proposta por Romero et al. (2008), onde 30 gramas de amostra foram adicionadas em um tubo de ensaio (18 x 1,5 cm) e mantidas a 7 °C por 72 horas. A Massa Total da Amostra (MTA) (g) e a Massa Total do Soro Liberado (MTSL) (g) foram obtidas e empregadas no cálculo do IS, de acordo com a Equação 2.

$$IS = \frac{MTSL}{MTA} \times 100 (\%) \quad \text{Equação 2}$$

2.6 Extração e determinação de isoflavonas

A extração e determinação do teor de isoflavonas foram realizadas em amostras da FDS, do extrato aquoso de FDS e do concentrado. Esta extração foi realizada conforme metodologia proposta por Carrão-Panizzi, Góes-Favoni e Kikuchi (2002), com modificações. Para extração de isoflavonas na FDS, primeiramente pesou-se 100 mg de amostra, que foi transferida para um tubo de ensaio de 10 mL, onde adicionou-se 4 mL de uma solução extratora (70 % de etanol e 0,1 % de ácido acético). Para o extrato aquoso de FDS e o concentrado, utilizou-se uma alíquota de 1,5 mL de amostra adicionada de 2,5 mL da mesma solução extratora empregada anteriormente. Os tubos contendo as amostras e a solução extratora foram agitados em “Vortex” (Modelo MA162, MARCONI®, Piracicaba, SP, Brasil) e submetidos à extração por 1 hora em temperatura ambiente, sendo que neste período sofreram agitação a cada 15 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados em banho ultrassônico (Modelo USC5000, UNIQUE®, Indaiatuba, SP, Brasil) por 30 minutos. Uma alíquota de 1,5 mL deste extrato foi transferida para tubos de microcentrifuga refrigerada (Modelo 5417R, EPENDORFF®, São Paulo, Brasil) e centrifugados a 20.800g por 15

minutos, em temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de membranas com poros de 0,45 µm (MILLIPORE®, Billerica, MA, EUA), sendo 20 µL do extrato filtrado injetados no cromatógrafo.

A separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas de acordo com a Berhow (2002), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de arranjo de foto diodo (Modelo 996) e injetor automático de amostras (Modelo 717 Plus) da WATERS® (Milford, EUA). Utilizou-se nesta etapa uma coluna de fase reversa (YMC Pack ODS-AM®, 250 mm x 0,4 mm de diâmetro). Para a separação das isoflavonas, adotou-se o sistema de gradiente linear binário, tendo como fases móveis: (a) metanol contendo 0,025 % de ácido trifluoroacético (TFA) (fase A) e (b) água ultrapura (MILLIPORE®, Billerica, MA, EUA) contendo 0,025 % de TFA (fase B). A condição inicial do gradiente foi de 20 % para a fase A, atingindo 90 % em 35 minutos, seguido de limpeza da coluna com 100 % de fase A durante 5 minutos para, em seguida, retornar a 20 % e permanecer nestas condições por até 60 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/minuto e a temperatura durante a corrida foi de 25 °C. Para a detecção das isoflavonas, ajustou-se o comprimento de onda do detector para 254 nm. O *software* utilizado para controle do equipamento e aquisição de dados foi *Millenium 32* (versão 3.05.01) (GCLC® Toronto, Pickering, ON, Canadá). Para a identificação e quantificação dos picos correspondentes a cada uma das isoflavonas foram utilizadas curvas de calibração com regressão linear baseados nas áreas dos picos, com padrões externos de daidzina, daidzeína, genistina, genisteína, glicitina, gliciteína, malonil daidzina, malonil genistina, malonil glicitina, acetil daidzina, acetil genistina e acetil glicitina todos solubilizados em metanol (grau cromatográfico), nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL, respectivamente. Os resultados de isoflavonas da FDS foram expressos em mg isoflavona/100g de amostra sólida e, para os extratos, em µg isoflavona/mL de extrato.

Todas estas análises foram realizadas em duplicata.

2.7 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (5 % de significância) foram empregados na análise dos dados através do *software* STATISTICA 7.0 (2004) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA), e os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Nanofiltração (NF)

O comportamento do fluxo do permeado (J) durante a NF do extrato aquoso de FDS é mostrado na Figura 3. Comportamento semelhante foi observado por Hódur et al. (2009) na concentração por membranas de produtos similares, a partir de extratos aquosos. Noordman et al. (2003) e Habert, Borges e Nóbrega (2006) relatam que alimentos líquidos com altos teores de proteínas tendem a apresentar tal comportamento. Além disso, Liikanen, Yli-Kuivila e Laukkanen (2002), Warczok et al. (2004), Van der Bruggen, Mänttari e Nyström (2008) e Suárez et al. (2009) atribuem este declínio à camada de polarização, em decorrência do processo de concentração, e ao *fouling*, ambos os fenômenos normalmente presentes nos processos de separação por membranas.

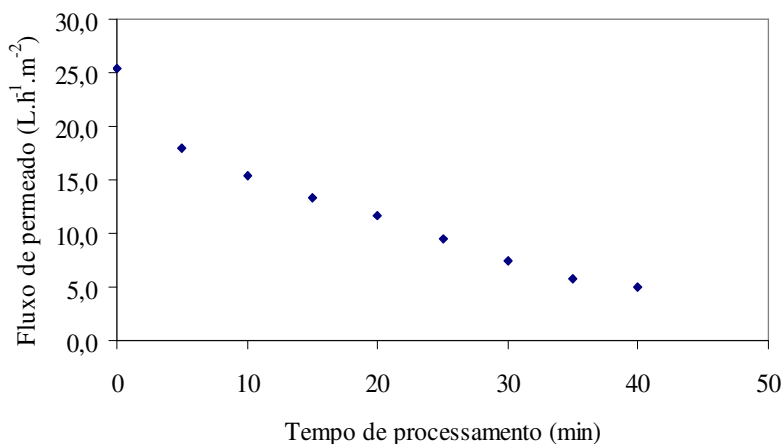


Figura 3 Comportamento do fluxo do permeado (J) durante o processo de NF do extrato aquoso de farinha desengordurada de soja.

O J médio obtido apresentou valor de $12,4 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Estes resultados foram similares aos obtidos por Diaz-Reinoso et al. (2009), para concentrados de extrato aquoso de destilado de bagaço de uva fermentada, e por Luo et al. (2009) na remoção do sal de milho de soja, todos empregando a NF, onde os fluxos médios foram de 10 a $70 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ e de $6,64 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, respectivamente. Apesar de serem produtos

diferentes, as similaridades entre os processos, com exceção da pressão utilizada, permitem a comparação entre os resultados. Entretanto, a menor pressão utilizada, em torno de 7 bar, segundo Mello, Petrus e Hubinger (2010), normalmente não são características de processos de NF, entretanto são suficientes para que o processo aconteça, e seja ainda mais viável em decorrência dos menores gastos energéticos a baixas pressões. Além disso, Wang e Murphy (1996), Chien et al. (2005), Rostagno, Palma e Barroso (2005), Alothman, Bhat e Karim (2009), Nufer, Ismail e Hayes (2009) e Shimoni (2009) relatam que baixos tempos de processamento seriam ideais para a manutenção do teor de isoflavona. Desta forma justificam-se os parâmetros utilizados no processo de NF do extrato aquoso de FDS.

3.2 Análise físico-química

A composição físico-química das amostras de FDS, do extrato aquoso de FDS e do concentrado está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 Resultado da análise físico química (médias \pm desvio padrão) das amostras de Farinha Desengordurada de Soja (FDS), do extrato aquoso de FDS e do concentrado obtido pelo processo de nanofiltração.

Análise	FDS	Extrato aquoso de FDS	Concentrado
Umidade (% m/m)	11,55 \pm 0,06	NA	NA
Sólidos totais (% m/m)	NA	4,00 ^b \pm 0,02	7,00 ^a \pm 0,03
Lipídeos (% m/m)	8,86 \pm 0,19	< 0,10 ^a	< 0,10 ^a
Cinzas (% m/m)	4,99 \pm 0,04	0,60 ^b \pm 0,03	1,00 ^a \pm 0,03
Proteínas (% m/m)	42,27 \pm 0,51	1,90 ^b \pm 0,03	2,40 ^a \pm 0,04
Fibras totais (% m/m)	22,70 \pm 0,00	NA	NA
Carboidratos totais (% m/m)	9,64 \pm 0,24	1,60 ^b \pm 0,03	3,70 ^a \pm 0,05

NA = Não Avaliado.

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as análises realizadas.

Os resultados das análises físico químicas da FDS mostram similaridades àquelas encontradas na literatura, quanto aos teores de lipídeos, cinzas e proteínas. Khetarpaul et al. (2004) encontraram 8,50 % de lipídeos em farinha desengordurada de soja, enquanto produto similar avaliado por Liu et al. (1997) continha 6,50 % de cinzas. Kumar et al. (2002) encontraram teores de proteínas em farinha desengordurada de soja em torno de 48,00 %. Em geral, a composição físico-química do extrato aquoso de FDS é semelhante aos extratos hidrossolúveis de soja obtidos por Prudêncio e Benedet (1999) e Ciabotti et al. (2006). Ressalta-se que o baixo teor de lipídeos do extrato aquoso de FDS ameniza os problemas relacionados ao *fouling* da membrana (SABOYA; MAUBOIS, 2000). As variações na composição deste extrato aquoso de FDS em relação aos resultados de outros trabalhos ocorre, segundo Mandarino, Carrão-Panizzi e Oliveira (1992) e Seibel e Beléia (2009) em função da variedade de soja utilizada e aos diferentes processos empregados para sua obtenção.

Para se verificar a qualidade e a estabilidade física do extrato aquoso de FDS, durante a NF, foram determinados o seu pH, que foi igual a $5,05 \pm 0,01$, e o seu Índice de Sedimentação (IS), igual a $2,7 \pm 0,14$ %. Além do pH do extrato aquoso estar na faixa recomendada (3,00 a 9,00) de estabilidade da membrana, ele situa-se acima do ponto isoelétrico das proteínas da soja ($\text{pH} < 4,5$). Segundo Torrezan e Cristianini (2005), um pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas, pode resultar na precipitação das mesmas levando ao entupimento rápido das membranas. Já o IS do extrato aquoso foi semelhante ao encontrado por Rodrigues, Gozzo e Moretti (2003) em extrato de isolado proteico de soja. Estes autores atribuem este resultado ao baixo teor de sólidos totais do extrato. Entretanto, baixos IS são desejáveis na NF, pois, de acordo com Razavi, Harris e Sherkat (1996) e Kumar, Yea e Cheryan (2004) altos teores de sólidos totais contribuem para o rápido *fouling* das membranas, comprometendo o processo.

3.3 Teores de isoflavonas

Os teores de isoflavonas nas amostras de FDS, extrato aquoso de FDS e concentrado estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados (médias ± desvio padrão) de isoflavonas nas amostras de Farinha Desengordurada de Soja (FDS) (mg/100 g), extrato aquoso de FDS (µg isoflavona/g em pés seco) e concentrado obtido através da Nanofiltração (µg isoflavona/g em peso seco).

Isoflavonas	Amostra		FDS	Extrato aquoso de FDS	Concentrado
Malonil Glicosídeos	Malonil Genistina		97,53 ± 0,84	189,02 ^b ± 1,38	385,21 ^a ± 33,88
	Malonil Daidzina		69,56 ± 0,36	363,90 ^b ± 5,31	757,66 ^a ± 11,76
	Malonil Glicetina		3,59 ± 0,29	168,71 ^b ± 1,07	350,25 ^a ± 15,90
β-Glicosídeos	Genistina		67,92 ± 0,60	59,37 ^a ± 6,85	108,94 ^a ± 24,03
	Daidzina		48,35 ± 0,28	76,90 ^b ± 1,24	165,55 ^a ± 8,85
	Glicetina		3,07 ± 0,04	47,41 ^b ± 1,81	97,34 ^a ± 1,64
Acetil Glicosídeos	Acetil Genistina		ND	ND	ND
	Acetil Daidzina		ND	ND	ND
	Acetil Glicetina		ND	ND	ND
Agliconas	Genisteína		3,13 ± 0,04	103,50 ^a ± 1,20	120,40 ^a ± 32,31
	Daidzeína		2,00 ± 0,02	195,85 ^a ± 1,94	177,60 ^a ± 29,60
	Gliciteína		ND	95,37 ^a ± 2,57	89,05 ^a ± 14,57
Isoflavonas Totais			295,15 ± 0,29	1300,03 ^a ± 2,37	2251,98 ^b ± 169,25

ND = Não Detectado.
^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre as amostras.

Os altos teores de isoflavonas apresentados na FDS, estão de acordo com aqueles encontrados por Carrão-Panizzi et al. (2001). Estes autores sugerem a utilização da cultivar BRS 216 na elaboração de alimentos, devido aos seus altos teores de isoflavonas e proteínas. Além disso, estes altos teores de isoflavonas podem ser, também, devido à remoção de lipídeos da farinha de soja, antes da obtenção do extrato. Este resultado está de acordo com o afirmado por Coward et al. (1998), que verificaram um aumento no teor de isoflavonas em farinha desengordurada de soja, uma vez que a extração de lipídeos promove a concentração de outros sólidos totais, como as isoflavonas, que não estão presentes no óleo de soja.

Dentre os isômeros presentes na FDS, houve predominância dos conjugados malonil glicosídeos, representando 58 % do total de isoflavonas. Coward et al. (1998) também encontraram maiores concentrações destes conjugados em grãos de soja e farinhas de soja não torradas. Estes autores verificaram que processamentos, como a moagem e a extração de óleo em temperatura ambiente não alteram o teor e o perfil deste tipo de isoflavona. Já teores de 59 % de malonil glicosídeos foram encontrados por Góes-Favoni et al. (2004) em farinhas integrais de soja. Estes últimos autores também verificaram teores de malonil genistina (35 %) similares aos obtidos na FDS (33 %). Góes-Favoni (2002) observou o mesmo perfil de isoflavonas em farinha integral, com predominância dos compostos malonil e β -glicosídeos, sendo que na FDS elaborada neste trabalho, observou-se diminuição das formas conjugadas malonil e aumento das formas β -glicosídicas.

Os β -glicosídeos na FDS foram correspondentes a aproximadamente 40 % do teor de isoflavonas totais. Teores inferiores, em torno de 34 %, foram encontrados por YU et al. (2007) em farinha desengordurada de soja.

Na FDS obtida, os teores dos conjugados malonil glicosídeos e β -glicosídeos mantiveram-se em torno de 98 % do total de isoflavonas, estando de acordo com o trabalho realizado por Murphy, Barua e Hauck (2002), que ao testarem diferentes solventes para a extração de isoflavonas em farinha de soja, observaram que estes conjugados corresponderam, em média, a 90 % das isoflavonas totais.

Os conjugados acetil não foram detectados na FDS. Segundo Jung, Murphy e Sala (2008), a formação desses isômeros ocorre apenas quando a soja ou produtos à base de soja são submetidos à secagem, empregando-se altas temperaturas, como por exemplo, no processo de torrefação. As agliconas da FDS representaram 1,8 % do teor de

isoflavonas totais, de acordo com o encontrado por Wang e Murphy (1996) na soja *in natura* e em farinhas não torradas, onde os teores de agliconas corresponderam de 1 a 3 % das isoflavonas totais. Comparando os resultados obtidos com aqueles da literatura, quanto ao teor e perfil de isoflavonas, a FDS obtida da cultivar BRS 216 pode ser empregada na elaboração do extrato aquoso de FDS. Isso porque, de acordo com Nakajima et al. (2005) o teor de isoflavonas varia com a cultivar empregada.

O teor de isoflavonas totais presente no extrato aquoso de FDS foi similar ao encontrado por Góes-Favoni et al. (2004) que ao avaliarem dois extratos hidrossolúveis em pó, sendo um preparado a partir da moagem do grão e o outro do farelo desengordurado de soja, obtiveram teores de isoflavonas de 1800 e 1230 μg isoflavona/g, respectivamente. Assim como na FDS os isômeros predominantes foram os malonil glicosídeos. Entretanto, este resultado foi diferente do obtido por Coward et al. (1998), que encontraram como principais isômeros os β -glicosídeos, em extratos hidrossolúveis de soja. Tais diferenças poderiam ser decorrentes, conforme Huang, Liang e Kwok (2006), ao uso de tratamentos térmicos, como a pasteurização ou esterilização, pois o calor úmido, aplicado nas etapas de processamento, leva à desesterificação dos conjugados malonil e formação dos β -glicosídeos. Também no extrato aquoso de FDS foram encontrados maiores teores de agliconas do que os verificados por Góes-Favoni et al. (2004) em extrato hidrossolúvel de soja. Tal fato poderia ser atribuído ao tipo de cultivar utilizada e ao tratamento hidrotérmico (50 °C) realizado. Matura e Obata (1993) e Araújo et al. (1997) relatam que a temperatura de 50 °C, ideal para a atividade da enzima β -glicosidase em extratos aquosos, leva à formação de agliconas. Este resultado confirma o relatado por Chien et al. (2005) que afirma ser o tratamento térmico empregado o responsável pela conversão destes isômeros. No extrato de FDS as agliconas corresponderam a 30 % do teor de isoflavonas totais, sendo este resultado similar ao obtido por Xu et al. (2004), que verificaram teores de agliconas em torno de 34 % do total de isoflavonas, em resíduo líquido da produção de extrato de soja. Ribeiro et al. (2007) relatam que maiores teores de agliconas conferem maiores benefícios à saúde dos consumidores de produtos de soja, já que de acordo com Esteves e Monteiro (2001), Pascual-Teresa et al. (2006), Cederroth e Nef (2009) e Levis et al. (2010) as agliconas são diretamente absorvidas no trato gastrointestinal apresentando maior bioatividade do que as formas conjugadas. Entretanto, deve-se considerar que Setchell et al. (2002) relatam o inverso. Por outro lado,

Mazur et al. (1998), Ferrari e Demiate (2001), Brouns (2002), Rostagno, Palma e Barroso (2005), Barbosa, Lajolo e Genovese (2006) e Ranilla, Genovese e Lajolo (2009) afirmam que estudos quanto à biodisponibilidade e às propriedades funcionais são necessários.

Quanto aos teores de agliconas, como as genisteína, daidzeína e gliciteína o mesmo perfil verificado no extrato aquoso de FDS foi obtido por Huang, Liang e Kwok (2006), em extrato hidrossolúvel de soja. Dessa forma, o extrato aquoso produzido a partir de FDS seria indicado para a concentração de isoflavonas, a partir dos processos de separação por membranas, como a NF.

Após a NF do extrato aquoso de FDS, verificou-se aumento de 42 % ($p < 0,05$) dos teores de isoflavonas totais presentes no concentrado. Assim como o esperado, tanto no extrato aquoso de FDS como no concentrado, não foram detectados teores de acetil glicosídeos, sendo este resultado compatível com a ausência também na farinha de FDS. Entretanto, com exceção deste componente, o aumento observado no teor das demais isoflavonas não foi proporcional ao FRV utilizado ($FRV = 4$). Isto pode ser explicado, segundo Lui et al. (2003), pela baixa solubilidade das isoflavonas em água, com destaque para as agliconas. Além disto, de acordo com Wang e Murphy (1996), pode ocorrer associação das isoflavonas com as proteínas da soja, que podem ficar adsorvidas na superfície da membrana (VAN DER BRUGGEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÖM, 2008; SUÁREZ et al., 2009).

Quando comparado ao extrato aquoso de FDS, os teores dos conjugados glicosídeos foram maiores ($p < 0,05$) no concentrado. Já os teores de agliconas não foram diferentes ($p > 0,05$) entre o extrato aquoso de FDS e o concentrado. Estas variações poderiam ser explicadas através das diferentes massas molares definidas por Nurmi et al. (2002), para os conjugados glicosídeos (entre 400 e 600 g/mol) e as agliconas (entre 200 e 300 g/mol), levando em consideração o *cut-off*, entre 150 e 300 g/mol, da membrana utilizada.

Enfim, vale salientar que quando comparada a outros processos de concentração, a NF além de ser conduzida a baixas temperaturas, reduz o consumo de energia, conseguindo preservar as propriedades funcionais de compostos de interesse, neste caso as isoflavonas.

CONCLUSÃO

O fluxo permeado obtido na nanofiltração do extrato aquoso de FDS teve um comportamento típico para este tipo de processo, onde os fenômenos de polarização por concentração e *fouling* da membrana, levam a uma redução gradual deste fluxo. No concentrado e no extrato submetido à nanofiltração não foram detectados teores de acetil glicosídeos. Através da nanofiltração foi possível a concentração de isoflavonas totais, principalmente dos conjugados glicosídicos. Possivelmente não houve retenção de agliconas pela membrana. Os resultados obtidos para o perfil e os teores de isoflavonas do concentrado, demonstraram que é viável a utilização da nanofiltração na concentração de isoflavonas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-oestrogens and Western diseases. **Annals of Medicine**, v.29, p.95-120, 1997.
- ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A.A. Effects of radiation processing on phytochemicals and antioxidants in plant produce. **Trends in Food Science and Technology**, v.20, p.201-212, 2009.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists**. 18th ed. Maryland, USA, 2005.
- ARAÚJO, J. M. A.; CARLOS, J. C. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de β -glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 137-141, 1997.
- BARBOSA, A.C.L.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M. I. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. **Food Chemistry**, v. 98, p.757-766, 2006.
- BARNES, S.; PRASAIN, J.; D’ALESSANDRO, T.; WANG, C.C.; ZHANG, H.; KIM, H. Soy Isoflavones. In: HEBER, D.; BLACKBURN, G.; GO, V.; MILNER, J. **Nutritional Oncology**. San Diego: Elsevier, 2006. V.2, Cap.32, p.559-571.
- BERHOW, M.A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B.S.; MANTHEY, J.A. **Flavonoids in the Living Cell**. New York: Klusher, 2002. 505 p.
- BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. **Food Research International**, v.35, p.187-193, 2002.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A.S.; SILVA, J.B.; KIKUCHI, A.; MANDARINO, J.M.G.; MIRANDA, L.C. Desenvolvimento de germoplasma de soja com características adequadas para o consumo in natura e para a indústria de alimentos. **Documentos Embrapa Soja**, v.191, p.19-20, 2001.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; GÓES-FAVONI, S.P.; KIKUCHI, A. Extraction time for isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.45, n.4, p.515-518, 2002.

CEDERROTH, C.R.; NEF, S. Soy, isoflavones and metabolism: a review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.304, n.1, p.30-42, 2009.

CHANG, S.K.C. 2002. Isoflavones from soybeans and soy foods. In: SHI, J.; MAZZA, G.; LEMAGUER, M. **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Boca Raton: CRC Press, 2002. V.2, p 39-69.

CHIEN, J.T.; HSIEH, H.C.; KAO, T.H.; CHEN, B.H. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. **Food Chemistry**, v.91, p. 425-434, 2005.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M.F.P.; MANDARINO, J.M.G.; TARONE, A.G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.5, p.920-929, 2006.

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1486-1491, 1998.

CRAIG, W.J. Health effects of vegan diets. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.89, suppl:16, p.27-33, 2009.

CUARTAS-URIBE, B.; ALCAINA-MIRANDA, M.I.; SORIANO-COSTA, E.; BES-PIA, A. Comparison of the behavior of two nanofiltration membranes for sweet whey demineralization. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1094-1101, 2007

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H. PARAJÓ, J.C. Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. **Journal of Food Engineering**, v.91, p.587-593, 2009.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v.14, n.1, p.43-52, 2001.

FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits. **Food Reviews International**, v.20, p.51-75, 2004.

FERRARI, R.A.; DEMIATE, I.M. Isoflavonas de soja- Uma breve revisão. **Biological and Health Sciences**, v.7, n.1, p.39-46, 2001.

GENOVESE, M.I.; BARBOSA, A.C.L.; PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M. Commercial soy protein ingredients as isoflavones sources for functional foods. **Plants Foods for Human Nutrition**, v.62, p.53-58, 2007.

GÓES- FAVONI, S. **Desenvolvimento de Farinha de Soja [Glycine max (L.) Merrill] com Maior Teor de Genisteína**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UEL, Londrina.

GÓES- FAVONI, S.; BELEIA, A.D.P.; CARRÃO-PANIZZLI, M.C.; MANDARINO, J.M.G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.582-586, 2004.

GÓES-FAVONI, S.; CARRÃO-PANIZZLI, M.C.; BELEIA, A. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. **Food Chemistry**, v.119, p.1605-1612, 2010.

HABERT, A., C; BORGES, C.P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. 180p.

HODÚR, C.; KERTÉSZ.; BESZÉDES, S.; LÁSZLÓ, Z.; SZABÓ, G. Concentration of marc extracts by membrane techniques. **Desalination**, v.241, p.265-271, 2009.

HUANG, H.; LIANG, H.; KWOK. Effect of thermal processing on genistein, daidzein and glycitein content in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.1110-1114, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4º ed. São Paulo: IAL, 2005.

JUNG, S.; MURPHY, P.A.; SALA, I. Isoflavones profile of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. **Food Chemistry**, v.111, p.592-598, 2008.

KHETARPAUL, N.; GREWAL, R.B.; GOYAL, R.; GARG, R. Development of partially defatted soy flour and dhal. **Food Chemistry**, v.87, p.355-359, 2004.

KUMAR, R.; CHOUDHARY, V.; MISHRA, S.; VARMA, I. K.; MATTIASON, B. Adhesives and plastics based on soy protein products. **Industrial Crops and Products an International Journal**, v.16, n.3, p. 155-172, 2002.

KUMAR, N.S.K.; YEA, M.K.; CHERYAN, M. Ultrafiltration of soy protein concentrate: performance and modeling of spiral and tubular polymeric modules. **Journal of Membrane Science**, v.244, p.235-242, 2004.

LEE, S.W.; LEE, J.H. Effects of oven-drying, roasting, and explosive puffing process on isoflavone distributions in soybeans. **Food Chemistry**, v.112, p.316-320, 2009.

LEVIS, S.; STRICKMAN-STEIN, N.; DOERGE, D.R.; KRISCHER, J. Design and baseline characteristics of the soy phytoestrogens as replacement estrogen (SPARE) study - A clinical trial of the effects of soy isoflavones in menopausal women. **Contemporary Clinical Trials**, 2010; doi:10.1016/j.cct.2010.03.007.

LIIKANEN, R.; YLI-KUIVILA, J.; LAUKKANEN, R. Efficiency of various chemical cleanings for nanofiltration membrane fouled by conventionally-treated surface water. **Journal of Membrane Science**, v.195, p.265-276, 2002.

LIU, K. Soybean Protein Products. In: LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman e Hall, 1997. Cap. 8, p. 379-411.

LUI, M.C.Y.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; PARK, Y.K Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.206-212, 2003.

LUO, J.; DING, L.; CHEN, X.; WAN, Y. Desalination of soy sauce by nanofiltration. **Separation and Purification Technology**, v.66, p.429-437, 2009.

LUTHRIA, D, L.; BISWAS , R.; NATARAJAN, S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. **Food Chemistry**, v.105, p.325-333, 2007.

MACHADO, F.P.P.; QUEIRÓZ, J.H.; OLIVEIRA, M.G.A.; PIOVESAN, N.D.; PELUZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MOREIRA, M.A. Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. **Food Chemistry**, v.107, p.649-655, 2008.

MAHUNGU, S.M.; MERCADO, S.D.; LI, J.;SCHWENK, M.; SINGLETARY, K.; FALLER, J. Stability of isoflavones during extrusion processing of corn/soy mixture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.279-284, 1999.

MANDARINO, J. M. G. ; CARRÃO-PANIZZII, M.; OLIVEIRA, M.C.N. Chemical composition of soybean seeds from different production areas of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.35, p.647-653, 1992.

MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.

MAZUR, W.; ADLERCREUTZ, H. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. **Pure and Applied Chemistry**, v.70, n.9, p.1759-1776, 1998.

MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J. C.C.; HUBINGER, M.D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.533-539, 2010.

MURPHY, P. A.; BARUA, K.; HAUCK, C. C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavonas in soy foods. **Journal of Chromatography B**, v.777, p.129-138, 2002.

NAKAJIMA, N.; NOZAKI, N.; ISHIHARA, K.; ISHIKAWA, A.; TSUJI, H. Analysis of isoflavone content in tempeh, a fermented soybean and preparation of a new isoflavone-enriched tempeh. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.6, p.685-687, 2005

NOORDMAN, T.R.; KOOIKER, K.; BEL, W.; DEKKER, M.; WESSELINGH, J.A. Concentration of aqueous extracts of defatted soy flour by ultrafiltration: Effect of suspended particles on the filtration flux. **Journal of Food Engineering**, v.58, p.135-141, 2003.

NUFER, K.R.; ISMAIL, B.; HAYES, K.D. The effects of processing and extraction conditions on content, profile, and stability of isoflavones in a soymilk system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, n.4, p.1213-1218, 2009.

NURMI, T.; MAZUR, W.; HEINOMEN, S.; HOKKONEN, J.; ADLERCREUTZ, H. Isoflavone content of the soy based supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, p.1-11, 2002.

PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H.A.A.; SCAPARINI, A.R.P. Conversão de malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.2, p.130-135, 2002.

PASCUAL-TERESA, S.; HALLUND, T.J.; TALBOT, D.; SCHROOT, J.; WILLIAMS, C.M.; BUGEL, S.; CASSIDY, A. Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p.257-264, 2006.

PAUCAR-MENACHO, L.M.; AMAYA-FARFÁN, J.; BERHOW, M.A.; MANDARINO, J.M.G.; MEJIA, E.G.; CHANG, Y.K. A high-protein soybean cultivar contains lower isoflavones and saponins but higher minerals and bioactive peptides than a low-protein cultivar. **Food Chemistry**, v.120, p.15-21, 2010.

PRUDÊNCIO, E. S.; BENEDET, H. D. Aproveitamento do soro de queijo na obtenção do extrato hidrossolúvel de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, p.97-101, 1999.

RANILLA, L.G.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, p.397-404, 2009.

RAZAVI, S.K.S.; HARRIS, J.L.; SHERKAT, F. Fouling and cleaning of membranes in the ultrafiltration of the aqueous extract of soy flour. **Journal of Membrane Science**, v.114, p.93-104, 1996.

RIAZ, M.N. Soybeans as Functional Foods. **Cereal Foods World**, v.44, n.2, p.88-92, 1999.

RIBEIRO, M.L.L.; MANDARINO, J.M.G.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; OLIVEIRA, M.C.N.; CAMPO, C.B.H.; NEPOMUCENO, A.L.; IDA, E.I. Isoflavone content and b-glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p.19-24, 2007.

RODRIGUES, R.S.; GOZZO, A.M.; MORETTI, R.H. Comportamento reológico de extratos de grãos, farinha integral e isolado protéico de soja. **Boletim CEPPA**, v.21, n.2, p.367-378, 2003.

ROMERO, A.; CARDOBÉS, F.; PUPPO, M.C.; GUERRERO, A.; BENGOCHEA, C. Rheology and droplet size distribution of emulsions stabilized by crayfish flour. **Food Hydrocolloids**, v.22, n.6, p.1033-1043, 2008.

ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects. **Food Chemistry**, v.93, p.557-564, 2005.

SABOYA, L.V.; MAUBOIS, J.L. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. **Lait**, v.80, p.541-553, 2000.

SEIBEL, N.F.; BELÉIA, A.D.P. Características químicas e funcionalidade tecnológica de ingredientes de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]: carboidratos e proteínas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.2, p.113-122, 2009.

SETCHELL, K.D.R.; CASSIDY, A. Dietary Isoflavones: Biological effects and relevance to human health. **The Journal of Nutrition**, v.129, p.758-767, 1999.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W.T.; WOLFE, B.E.; KIRSCHNER, A.S.; HEUBI, J.E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.447-453, 2002.

SHIMONI, E. Satability and shel life of bioactiv compounds during food processing and storage: soy isoflavones. **Journal of Food Science**, v.69, n.6, p.160-166, 2009.

SILVA, M.S.; NAVES, M.M.V.; OLIVEIRA, R.B.; LEITE, O.S.M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.571-576, 2006.

SUÁREZ, E.; LOBO, A.; ALVAREZ, S.; RIERA, F.A.; ÁLVAREZ, R. Demineralization of whey and milk ultrafiltration permeate by means of nanofiltration. **Desalination**, v.241, p.272-280, 2009.

TORREZAN, R.; CRISTIANINI, M. Revisão: efeito do tratamento sob alta pressão sobre as propriedades funcionais da proteína de soja e interação proteína- polissacarídeos. **Boletim CEPPA**, v.23, n.2, p.201-220, 2005.

TSUI, E. M.; CHERYAN, M. Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of Corn. **Journal of Food Engineering**, v.83, p.590-595, 2007.

TSUMURA, K.; SAITOA, T.; TSUGEA, K.; ASHIDAA, H.; KUGIMIYAA, W.; INOUE, K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. **LWT- Food Science and Techonology**, v.38, p.255-261, 2005.

UMPHRESS, S.T.; MURPHY, S.P.; FRANKE, A.A.; CUSTER, L.J.; BLITZ, C.L. Isoflavone content of foods with soy additives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.533-550, 2005.

VAN DER BRUGGEN, B.; MÄNTTÄRI, M.; NYSTRÖM, M.
Drawbacks of applying nanofiltration and how to avoid them: A review.
Separation and Purification Technology, v.63, p.251–263, 2008.

WANG, H-J; MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.2377-2383, 1996.

WANG, X.L.; SAHNG, W.J.; WANG, D.X.; WU, L.; TU, C.H.
Characterization and applications of nanofiltration membranes: State of the art. **Desalination**, v.236, p.316-326, 2009.

WARCZOK, J.; FERRANDO, M.; LÓPEZ, F.; GÜELL, C.
Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressure.
Journal of Food Engineering, v.63, n.1, p. 63-70, 2004.

WU, J.; MUIR, A.D. Isoflavone during protease hydrolysis of defatted soybean meal. **Food Chemistry**, v.118, n.2, p.328-332., 2009.

XU, L.; LAMB, K.; LAYTON, L.; KUMAR, A. A membrane-based process for recovering isoflavones from a waste stream of soy processing. **Food Research International**, v.37, p.867–874, 2004.

XU, L.; WANG, S. The *Ginkgo biloba* extract concentrated by nanofiltration. **Desalination**, v.184, p.305-313, 2005.

YU, J.; LIU, Y.F.; QIU, A.Y.; WANG, X.G. Preparation of isoflavones enriched soy protein isolate from defatted soy hypocotyls by supercritical CO₂. **LWT- Food Science and Technology**, v.40, p.800-806, 2007.

CAPÍTULO 3

**Efeito dos binômios temperatura e tempo no teor de isoflavonas do
concentrado aquoso de soja obtido a partir da nanofiltração**

RESUMO

O concentrado obtido pela nanofiltração do extrato aquoso de Farinha Desengordurada de Soja (FDS) foi submetido a diferentes tratamentos térmicos, variando-se a temperatura (70 a 90 °C) e o tempo (15 a 45 minutos), de acordo com um Delineamento Estatístico Central Composto Rotacional (DCCR 2^k). Os teores de isoflavonas do concentrado avaliados após os tratamentos térmicos foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os teores de malonil glicosídeos sofreram influência somente da temperatura ($p < 0,05$), enquanto os β -glicosídeos sofreram alterações em função da temperatura, do tempo e da interação destes ($p < 0,05$). Já em relação às agliconas e isoflavonas totais, os tratamentos térmicos empregados não provocaram alterações nos seus teores ($p > 0,05$). Dessa forma, verificou-se que os tratamentos térmicos empregados no concentrado, apesar de provocarem modificações no perfil e concentração das formas conjugadas, preservaram o teor de isoflavonas totais e de agliconas.

Palavras-Chave: soja, isoflavonas, tratamento térmico.

ABSTRACT

The concentrate obtained from the aqueous extract from Defatted Soy Flour (DSF) was subjected to different thermal treatments varying the temperature (70-90°C) and the exposure time (15-45 minutes), based on Central Composite Rotational Design (CCRD 2^k). The isoflavones content in the concentrate was evaluated after the thermal treatments, and it was determined by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The level of malonyl glycosides was only influenced by temperature ($p < 0.05$) while the β -glycosides presented changes with the temperature, the time and also with the interaction of these two variables ($p < 0.05$). Concerning the aglycones and the total isoflavones, the thermal treatments applied in this experiment did not change its contents ($p > 0.05$). Thus, it was verified that the thermal treatments used in the concentrate maintained the levels of total isoflavones and aglycones, although it caused changes in profile and concentration of conjugated forms.

Keywords: soybean, isoflavones; thermal treatment.

1 INTRODUÇÃO

A nanofiltração é um processo de separação por membranas com diversas aplicações, dentre elas a concentração de compostos em solução aquosa (PETERSEN, 1993; WANG et al., 2009). A concentração de compostos por nanofiltração visa à obtenção de produtos com alto valor agregado, com características nutricionais e funcionais de grande aplicação em alimentos (GOULAS; GRANDISON; RASTALL, 2003; VINCZE; VATAI, 2004; WARCZOK et al., 2004).

Dentre os compostos obtidos a partir de plantas, de grande interesse funcional e com alta atividade biológica estão as isoflavonas, que são uma classe de flavonóides presentes principalmente na soja (*Glycine max*) (CHIEN et al., 2005). Esses compostos vêm sendo avaliados devido ao seu potencial funcional quando consumidos regularmente (MESSINA; BARNES; SETCHELL, 1997; ANDERSON et al., 1999; LISSIN; COOKE, 2000;). Entretanto, o teor de isoflavonas na soja depende de diversos fatores, tais como a cultivar, as condições ambientais de cultivo, os métodos de processamento de produtos da soja, dentre outros (CARRÃO-PANIZZI; SIMÃO; KIKUCHI, 2003).

As principais isoflavonas da soja incluem genisteína, daidzeína e gliciteína, cada uma existindo em quatro formas químicas, ou seja, agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína), β -glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina), acetil glicosídeos (6'-*O*-acetilgenistina, 6'-*O*-acetildaidzina e 6'-*O*-acetilglicitina) e malonil glicosídeos (6'-*O*-malonilgenistina, 6'-*O*-malonildaidzina e 6'-*O*-malonilglicitina) (EISEN; KUMAR; SHIMONI, 2003). Estudos mostram que das 12 isoflavonas encontradas na soja ou produtos da soja, em torno de 98 % constituem as formas conjugadas (β -glicosídeos, acetil glicosídeos e malonil glicosídeos) (WANG; MURPHY, 1994). No grão da soja e produtos minimamente processados, predominam os conjugados malonil, podendo ser convertidos nas formas acetil e β -glicosídicas durante os processamentos térmicos (BARNES et al., 1998). A formação das agliconas ocorre em maiores quantidades em temperaturas amenas, em torno de 50 °C, e também durante processos fermentativos, pela ação das enzimas β -glicosidase (FUKUTAKE et al., 1996; SUTIL et al., 2008). Segundo Huang, Liang e Kwok (2006), o aquecimento é uma importante variável do processamento que pode causar alterações no perfil e concentração de isoflavonas em produtos da soja. Tecnologicamente e nutricionalmente, é importante avaliar as

transformações e as perdas nos teores de isoflavonas em alimentos a base de soja, em função dos tratamentos térmicos aplicados durante seu processamento (EISEN; UNGAR; SHIMONI, 2003; UNGAR; OSUNDAHUNSI; SHIMONI, 2003; HUANG; LIANG; KWOK, 2006; SHAO et al., 2009; NUFER; ISMAIL; HAYES, 2009). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos térmicos (temperatura *versus* tempo) no teor de isoflavonas no concentrado obtido a partir da nanofiltração do extrato aquoso de Farinha Desengordurada de Soja (FDS).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Neste trabalho foram utilizados grãos de soja da cultivar BRS 216, e os seguintes padrões: daidzina e daidzeína da Fujicco Co., Ltda (Tóquio, Japão); genistina e genisteína da Sigma Chemicals Co., Ltda (St Louis, MO, EUA.); glicitina, gliciteína, malonil daidzina, malonil genistina, malonilglicitina, acetil daidzina, acetil genistina e acetil glicitina da Wako (Anaheim, CA, EUA). Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico ou grau cromatográfico. As soluções foram devidamente preparadas e quando necessário padronizadas.

2.2 Elaboração do extrato aquoso da Farinha Desengordurada de Soja (FDS)

Os grãos de soja foram desidratados em estufa com circulação forçada de ar (Modelo 32O-SE, FANEM[®], São Paulo, Brasil) a 40 °C, durante 24 horas. Os grãos desidratados foram moídos em moinho de facas (VIBRAMATT[®], São Paulo, SP, Brasil), peneirados primeiramente em tamiz de 20 mesh e após em tamiz de 35 mesh (GRANUTEST[®], São Paulo, Brasil), visando à obtenção da farinha de soja. Desta farinha removeram-se os lipídeos com *n*-hexano em temperatura ambiente, obtendo-se então a Farinha Desengordurada de Soja (FDS). O extrato aquoso de FDS foi preparado pela hidratação da FDS na proporção 1:8 (FDS:água), que foi diluída em um volume de 1 litro de água e tratada termicamente a 50 °C por 15 horas, mantendo a agitação (120 rpm) em *shaker* com agitação orbital (Modelo TE-421,

TECNAL[®], Piracicaba, SP, Brasil). Após uma agitação adicional de 5 minutos foi realizada empregando agitador magnético (Modelo Q-261, QUIMIS[®], Diadema, SP, Brasil). Com a finalidade de remover as partículas maiores de farinhas, que poderiam causar o *fouling* da membrana, foram feitas duas etapas de filtração. A primeira etapa foi realizada em filtro de nylon (Brasholanda[®], Pinhais, PR, Brasil) e a segunda em filtro a vácuo com tela de poliamida de abertura igual a 7 µm (TEGAPE[®], Curitiba, PR, Brasil).

2.3 Nanofiltração (NF)

O extrato aquoso de FDS foi submetido ao processo de nanofiltração (NF) em uma unidade piloto, utilizando membrana orgânica (Modelo HL2521TF, GE Osmonics[®], Filadélfia, EUA) de polifluoreto de vinilideno com ponto molar de corte de 150-300 g/mol e área filtrante útil de 0,9 m². Os parâmetros operacionais controlados durante o processo foram temperatura (16 ±2 °C), pressão transmembrana (7 bar), e Fator de Redução Volumétrico (FRV) igual a 4 [FRV = V_a/V_r , onde V_a é o volume inicial de extrato de FDS utilizado na alimentação (L) e V_r é o volume final de retentado após a filtração (L)], resultando em um fluxo de permeado (J) médio de 12,4 L.h⁻¹.m⁻². A forma de obtenção do concentrado do extrato aquoso da FDS foi padronizada. Após o processamento, o equipamento de NF foi higienizado conforme instruções do fabricante.

2.4 Delineamento experimental

O concentrado obtido no FRV 4 durante a NF do extrato aquoso de FDS foi submetido a diferentes tratamentos térmicos, de acordo com o Delineamento Estatístico Central Composto Rotacional (DCCR 2^k) com a adição de pontos axiais. As variáveis independentes, temperatura (X_1) (°C) e tempo (X_2) (minutos), foram analisadas em três níveis equidistantes de variação, codificados como -1, 0 e +1. Os níveis codificados das variáveis e seus valores reais estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2. O delineamento experimental constituiu-se de quatro ensaios fatoriais (combinação dos níveis -1 e +1), quatro ensaios axiais (uma variável no nível ± α e a outra em zero) e três repetições no ponto central (duas variáveis no nível zero), totalizando 11 ensaios experimentais. Os pontos axiais (α) foram codificados por -1,414 e +1,414. Os experimentos no centro do delineamento foram realizados a

fim de estimar o possível erro puro. Todos os ensaios experimentais foram realizados em ordem aleatória a fim de minimizar o efeito da variabilidade inesperada nas respostas observadas devido aos erros sistemáticos. A variável dependente (resposta) foi o teor de isoflavonas (mg isoflavona/mL de extrato).

Os níveis das variáveis e do ponto central foram definidos com base em dados disponíveis na literatura para tratamentos térmicos de produtos de soja. Toda et al. (2000), Grün et al. (2001), Chien et al. (2005), Huang, Liang e Kwok (2006) utilizaram temperaturas entre 70 e 90 °C para avaliarem o perfil de isoflavonas e a cinética de degradação das mesmas.

Tabela 1 Níveis das variáveis utilizadas no delineamento experimental 2².

Variáveis independentes	Níveis de variação				
	- α	-1	0	+ 1	+ α
X1 Temperatura (°C)	66	70	80	90	94
X2 Tempo (min)	9	15	30	45	51

$\alpha = \pm 1,414$ para duas variáveis independentes.

Tabela 2 Matriz do delineamento experimental 2² com valores codificados e reais das variáveis independentes.

Ensaio	Codificados		Reais	
	X1	X2	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1	-1	-1	70	15
2	+1	-1	90	15
3	-1	+1	70	45
4	+1	+1	90	45
5	- α	0	66	30
6	+ α	0	94	30
7	0	- α	80	9
8	0	+ α	80	51
9	0	0	80	30
10	0	0	80	30
11	0	0	80	30

$\alpha = \pm 1,414$ para duas variáveis independentes.

2.5 Tratamento térmico do concentrado obtido a partir do extrato aquoso de FDS

Os tratamentos térmicos do concentrado do extrato aquoso de FDS, conforme estipulado no delineamento experimental, foram realizados em tubos de vidro com parede de 0,9 mm de espessura, diâmetro interno igual a 10 mm e com 11 cm de comprimento, medidas estas equivalentes a capacidade de 5 mL de concentrado. Estes tubos contendo as amostras de concentrado foram fechados e imersos em banho termostatizado (Modelo Q215M, CALLMEX[®], Florianópolis, SC, Brasil) na temperatura (termômetro INCOTERM[®], Porto Alegre, RS, Brasil) estipulada para cada ensaio do delineamento experimental. Ao final de cada ensaio, os tubos foram imediatamente imersos em banho de gelo para o resfriamento das amostras.

Após os tratamentos térmicos, os concentrados foram acondicionados em tubos Falcon de 50 mL, congelados e mantidos a -18 °C, até a determinação do teor de isoflavonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2.6 Extração e determinação de isoflavonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A extração de isoflavonas no concentrado foi realizada conforme metodologia proposta por Carrão-Panizzi et al. (2002), com modificações. Na extração utilizou-se uma alíquota de 1,5 mL de amostra do concentrado adicionada de 2,5 mL de solução extratora a (70 % de etanol e 0,1 % de ácido acético). Os tubos contendo as amostras e a solução extratora foram agitados em “Vortex” (Modelo MA162, MARCONI[®], Piracicaba, SP, Brasil) e submetidos à extração por 1 hora em temperatura ambiente, sendo que neste período sofreram agitação a cada 15 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados em banho ultrassônico (Modelo USC5000, UNIQUE[®], Indaiatuba, SP, Brasil) por 30 minutos. Após transferiu-se 1,5 mL desta amostra para tubos de microcentrífuga refrigerada (Modelo 5417R, EPENDORFF[®], São Paulo, Brasil) e centrifugados a 20.800g por 15 minutos, em temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de membranas com poros de 0,45 µm (MILLIPORE[®], Billerica, MA, EUA), sendo 20 µL do extrato filtrado injetados no cromatógrafo. A separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas de acordo com a Berhow (2002), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de

arranjo de foto diodo (Modelo 996) e injetor automático de amostras (Modelo 717 Plus) da WATERS® (Milford, EUA). Utilizou-se nesta etapa uma coluna de fase reversa (YMC Pack ODS-AM®, 250 mm x 0,4 mm de diâmetro). Para a separação das isoflavonas, adotou-se o sistema de gradiente linear binário, tendo como fases móveis: (a) metanol contendo 0,025 % de ácido trifluoroacético (TFA) (fase A) e (b) água ultrapura (MILLIPORE®, Billerica, MA, EUA) contendo 0,025 % de TFA (fase B). A condição inicial do gradiente foi de 20 % para a fase A, atingindo 90 % em 35 minutos, seguido de limpeza da coluna com 100 % de fase A durante 5 minutos para, em seguida, retornar a 20 % e permanecer nestas condições por até 60 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/minuto e a temperatura durante a corrida foi de 25 °C. Para a detecção das isoflavonas, ajustou-se o comprimento de onda do detector para 254 nm. O *software* para controle do equipamento e aquisição de dados foi *Millenium 32* (versão 3.05.01) (GCLC® Toronto, Pickering, ON, Canadá). Para a identificação e quantificação dos picos correspondentes a cada uma das isoflavonas foram utilizadas curvas de calibração com regressão linear baseados nas áreas dos picos, com padrões externos de daidzina, daidzeína, genistina, genisteína, glicitina, gliciteína, malonil daidzina, malonil genistina, malonil glicitina, acetil daidzina, acetil genistina e acetil glicitina, todos solubilizados em metanol (grau cromatográfico), nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL; e 0,1000 mg/mL, respectivamente. Os resultados de isoflavonas totais, dos conjugados malonil glicosídeos (somatório dos teores de malonil daidzina, malonil genistina e malonil glicitina) e β -glicosídeos (somatório dos teores de daidzina, genistina e glicitina) e das agliconas (somatório dos teores de daidzeína, genisteína e gliciteína) do concentrado foram expressos em mg isoflavona/mL de extrato. Todas estas análises foram realizadas em duplicata.

2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados de acordo com um Delineamento Estatístico Central Composto Rotacional (DCCR 2^k). Determinaram-se os coeficientes de regressão para os termos linear, quadrático e de interação entre as variáveis e a significância de cada coeficiente de regressão foi julgada estatisticamente computando o valor *t* do erro residual. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para validar o modelo (com nível de significância de 5 %). Os coeficientes de

regressão foram utilizados para gerar as superfícies de resposta. Todos os cálculos e gráficos foram feitos utilizando o *software* STATISTICA 7.0 (2004) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito das variações da temperatura e do tempo dos tratamentos térmicos no teor de isoflavonas do concentrado obtido a partir da NF do extrato aquoso de FDS está apresentado na Tabela 3.

Pôde-se observar que os menores teores de conjugados malonil e os maiores de β -glicosídeos foram obtidos nas condições que utilizaram maiores temperaturas, como nos ensaios 4 e 6. Wang e Murphy (1996) e Mathias et al. (2006) relatam que por serem termicamente instáveis, os malonil glicosídeos podem ser convertidos em β -glicosídeos, resultando na diminuição dos seus teores. Já em relação aos conjugados acetil estes não foram detectados no concentrado. O mesmo comportamento foi verificado por Barnes et al. (1998) e Kao et al. (2004), em produtos de soja, sendo que estes autores creditaram tal ocorrência à forma de processamento, principalmente a temperatura e umidade utilizadas.

Os teores de agliconas nos concentrados tratados termicamente não diferiram demonstrando que as temperaturas e tempos utilizados não foram suficientes para degradá-las, sendo o mesmo verificado por Kao et al (2004) em extratos hidrossolúveis de soja tratados a 100 °C por 30 minutos.

Assim como o observado por Rostagno, Palma e Barroso (2005), que relatam ser a temperatura o principal fator a ser considerado na estabilidade das isoflavonas durante o processamento de alimentos, pode-se verificar que os efeitos linear (L) e quadrático (Q) da temperatura foram significativos ($p < 0,05$) sobre o teor de malonil glicosídeos (Tabela 4). Já a variável tempo (L) e (Q), bem como o efeito de interação (tempo x temperatura), não apresentaram diferenças significativas no intervalo de confiança de 95 %.

Tabela 3 Resultados médios (\pm desvio padrão) dos teores dos conjugados malonil glicosídeos e β -glicosídeos, das agliconas e de isoflavonas totais (mg isoflavona/mL de concentrado) do concentrado obtido a partir da nanofiltração, segundo Delineamento Estatístico Central Composto Rotacional (DCCR 2^k).

En saíos	MALONIL GLICOSÍDEOS				B-GLICOSÍDEOS				AGLICONAS				Isoflavonas totais	
	Malonil daidzina	Malonil genistina	Malonil glicitina	Total *	Daidzina	Genistina	Glicitina	Total **	Daidzeína	Genisteína	Gliciteína	Total ***		
1	0,063 ($\pm 0,003$)	0,033 ($\pm 0,001$)	0,028 ($\pm 0,001$)	0,125 ($\pm 0,005$)	0,009 ($\pm 0,000$)	0,007 ($\pm 0,000$)	0,005 ($\pm 0,000$)	0,020 ($\pm 0,000$)	0,017 ($\pm 0,000$)	0,013 ($\pm 0,000$)	0,007 ($\pm 0,000$)	0,037 ($\pm 0,000$)	0,182 ($\pm 0,006$)	
2	0,061 ($\pm 0,001$)	0,033 ($\pm 0,000$)	0,028 ($\pm 0,000$)	0,120 ($\pm 0,001$)	0,012 ($\pm 0,000$)	0,009 ($\pm 0,000$)	0,005 ($\pm 0,000$)	0,027 ($\pm 0,000$)	0,017 \pm ($\pm 0,000$)	0,013 ($\pm 0,000$)	0,007 ($\pm 0,000$)	0,038 ($\pm 0,000$)	0,185 ($\pm 0,001$)	
3	0,064 ($\pm 0,000$)	0,033 ($\pm 0,000$)	0,029 ($\pm 0,000$)	0,126 ($\pm 0,000$)	0,010 ($\pm 0,002$)	0,008 ($\pm 0,000$)	0,005 ($\pm 0,001$)	0,023 ($\pm 0,001$)	0,017 ($\pm 0,000$)	0,014 ($\pm 0,000$)	0,008 ($\pm 0,000$)	0,039 ($\pm 0,001$)	0,189 ($\pm 0,002$)	
4	0,049 ($\pm 0,002$)	0,023 ($\pm 0,001$)	0,026 ($\pm 0,000$)	0,098 ($\pm ,003$)	0,019 ($\pm 0,000$)	0,014 ($\pm 0,000$)	0,007 ($\pm 0,001$)	0,039 ($\pm 0,001$)	0,017 ($\pm 0,000$)	0,014 ($\pm 0,000$)	0,007 ($\pm 0,001$)	0,038 ($\pm 0,001$)	0,176 ($\pm 0,004$)	
5	0,057 ($\pm 0,009$)	0,028 ($\pm 0,007$)	0,027 ($\pm 0,001$)	0,112 ($\pm 0,015$)	0,008 ($\pm 0,003$)	0,007 ($\pm 0,001$)	0,005 ($\pm 0,000$)	0,020 ($\pm 0,002$)	0,015 ($\pm 0,002$)	0,012 ($\pm 0,002$)	0,007 ($\pm 0,001$)	0,035 ($\pm 0,001$)	0,167 ($\pm 0,017$)	
6	0,048 ($\pm 0,000$)	0,025 ($\pm 0,001$)	0,020 ($\pm 0,000$)	0,093 ($\pm 0,001$)	0,016 ($\pm 0,002$)	0,013 ($\pm 0,000$)	0,007 ($\pm 0,000$)	0,036 ($\pm 0,002$)	0,015 ($\pm 0,001$)	0,012 ($\pm 0,000$)	0,007 ($\pm 0,001$)	0,035 ($\pm 0,001$)	0,165 ($\pm 0,004$)	
7	0,062 (\pm 0,000)	0,033 ($\pm 0,000$)	0,027 ($\pm 0,002$)	0,123 ($\pm 0,002$)	0,010 ($\pm 0,003$)	0,007 ($\pm 0,000$)	0,005 ($\pm 0,000$)	0,022 ($\pm 0,003$)	0,016 ($\pm 0,000$)	0,013 ($\pm 0,000$)	0,007 ($\pm 0,000$)	0,036 ($\pm 0,000$)	0,181 ($\pm 0,005$)	

8	0,057 (± 0,000)	0,030 (± 0,001)	0,024 (± 0,001)	0,111 (± 0,002)	0,014 (± 0,001)	0,010 (± 0,000)	0,007 (± 0,000)	0,031 (± 0,000)	0,017 (± 0,000)	0,013 (± 0,000)	0,009 (± 0,002)	0,039 (± 0,002)	0,180 (± 0,001)
9	0,061 (± 0,006)	0,033 (± 0,000)	0,029 (± 0,004)	0,121 (± 0,009)	0,011 (± 0,002)	0,009 (± 0,000)	0,005 (± 0,000)	0,025 (± 0,002)	0,017 (± 0,001)	0,013 (± 0,000)	0,007 (± 0,000)	0,038 (± 0,001)	0,183 (± 0,013)
10	0,057 (± 0,003)	0,033 (± 0,000)	0,027 (± 0,001)	0,114 (± 0,003)	0,013 (± 0,000)	0,009 (± 0,000)	0,005 (± 0,000)	0,027 (± 0,000)	0,017 (± 0,001)	0,014 (± 0,000)	0,007 (± 0,001)	0,038 (± 0,002)	0,178 (± 0,005)
11	0,062 (± 0,002)	0,031 (± 0,002)	0,027 (± 0,002)	0,120 (± 0,005)	0,013 (± 0,000)	0,009 (± 0,000)	0,005 (± 0,000)	0,027 (± 0,001)	0,018 (± 0,001)	0,014 (± 0,000)	0,012 (± 0,007)	0,043 (± 0,006)	0,186 (± 0,008)

* Total de Malonil glicosídeos = Somatório dos teores de malonil daidzina, malonil genistina e malonil glicitina.

** Total de β -glicosídeos = Somatório dos teores de daidzina, genistina e glicitina.

*** Total de Agliconas = Somatório dos teores daidzeína, genisteína e gliciteína.

Tabela 4 Análise de variância para as variáveis estudadas sobre o teor de malonil glicosídeos.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
(1) Temperatura (L)*	0,000437	1	0,000437	16,23458	0,010029
Temperatura (Q)*	0,000221	1	0,000221	8,20928	0,035192
(2) Tempo (L)	0,000167	1	0,000167	6,21890	0,054907
Tempo (Q)	0,000003	1	0,000003	0,10131	0,763132
1 (L) x 2(L)	0,000139	1	0,000139	5,15445	0,072408

L = efeito linear; Q = efeito quadrático; *valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Na Tabela 5, pôde-se observar que os conjugados β -glicosídeos apresentaram efeitos lineares (L) da temperatura e do tempo ($p < 0,05$) sobre os seus teores, bem como também foi verificado efeito de interação (tempo x temperatura). Já os efeitos quadráticos (tempo e temperatura) não foram significativos no intervalo de confiança de 95 %.

Tabela 5 Análise de variância para as variáveis estudadas tendo como resposta o teor de β -glicosídeos.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
(1) Temperatura (L)*	0,000269	1	0,000269	355,3286	0,000008
Temperatura (Q)	0,000003	1	0,000003	4,0211	0,101256
(2) Tempo (L)*	0,000093	1	0,000093	122,0869	0,000106
Tempo (Q)	0,000000	1	0,000000	0,0992	0,765502
1 (L) x 2(L)*	0,000022	1	0,000022	28,6781	0,003051

L = efeito linear; Q = efeito quadrático; *valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Nas Figuras 1 e 2, tem-se a representação do gráfico de Pareto, onde se pode visualizar os efeitos das variáveis tempo e temperatura sobre o teor de malonil glicosídeos e β -glicosídeos, respectivamente. Para os teores de malonil glicosídeos houve maior efeito da temperatura (L), e não houve interferência do tempo de processamento. Entretanto,

apresentou um efeito negativo para a temperatura, ou seja, quanto maior o valor empregado, menor o teor desse conjugado no concentrado. O efeito da temperatura sobre os conjugados malonil também foi observado por Murphy, Barua e Hauck (2002), em extrato hidrossolúvel de soja utilizando temperatura de 80 °C e tempo de 3 horas. Já Barnes, Kirk e Coward (1994), Jakson et al. (2002) e Kao et al. (2004) verificaram que a conversão de conjugados malonil em β -glicosídeos são dependentes do tempo e da temperatura. Através do gráfico de Pareto (Figura 5), observa-se que a temperatura (L) apresentou o maior efeito sobre o teor de β -glicosídeos, seguido do tempo (L). Porém, como o efeito de interação também foi significativo ($p < 0,05$), este deve ser avaliados em detrimento aos demais efeitos.

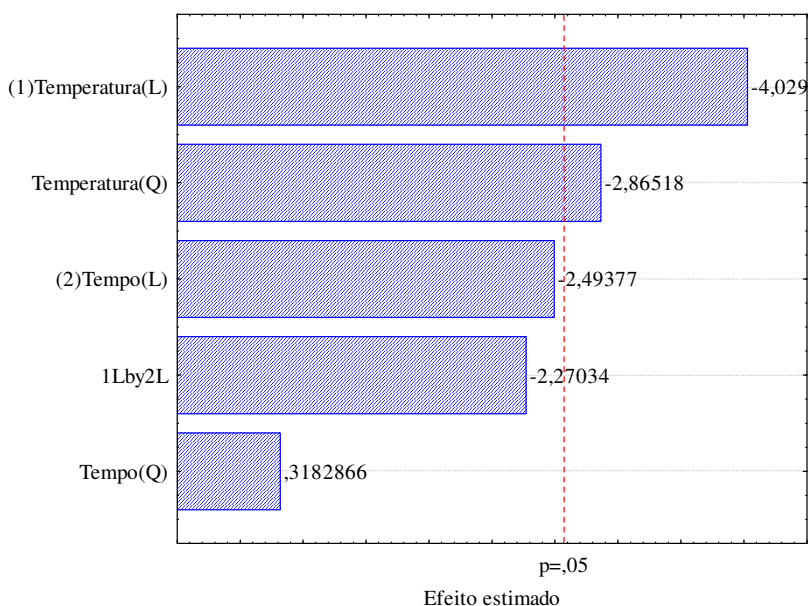


Figura 1 Representação do gráfico de Pareto indicando os efeitos do tempo e temperatura sobre o teor de malonil glicosídeos após os tratamentos térmicos dos ensaios avaliados.

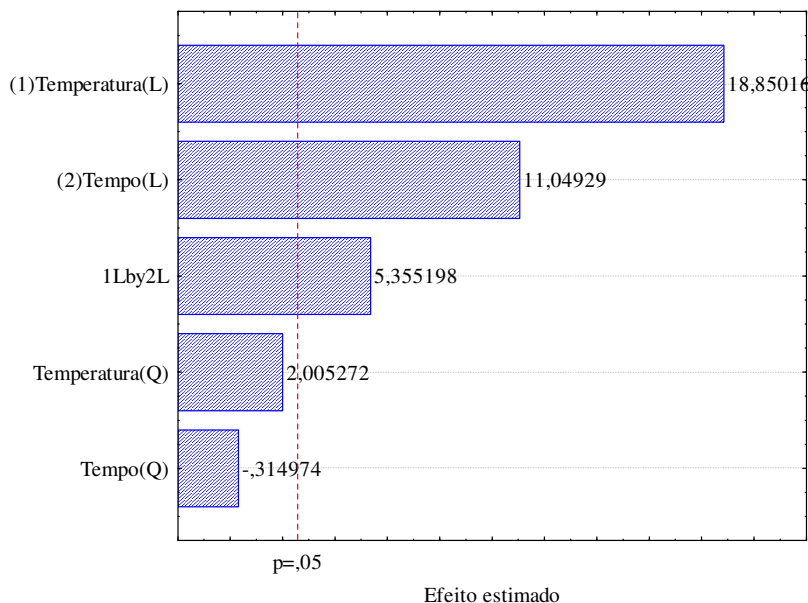


Figura 2 Representação do gráfico de Pareto indicando os efeitos do tempo e temperatura sobre o teor de β -glicosídeos após os tratamentos térmicos dos ensaios avaliados.

Na Figura 3 têm-se os valores observados *versus* valores preditos para o teor de β -glicosídeos, mostrando que os dados estão normalmente distribuídos em torno da linha de tendência, evidenciando um comportamento linear.

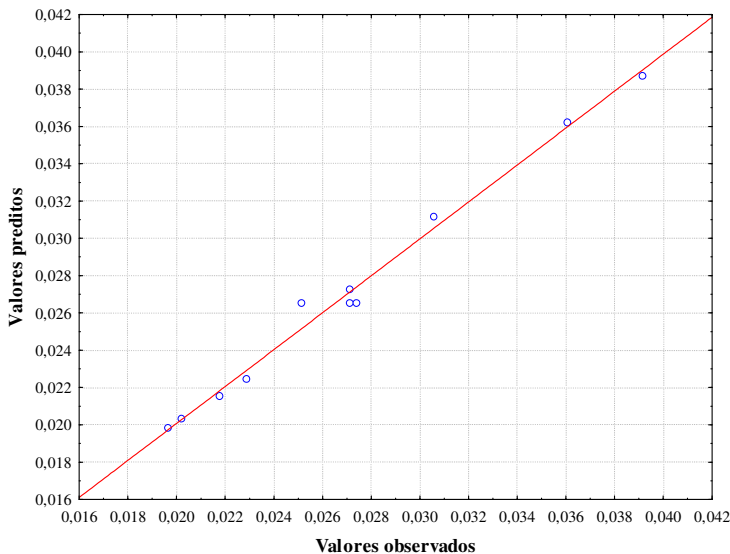


Figura 3 Distribuição normal dos dados observados experimentalmente e dos valores preditos pelo modelo.

A partir da análise do gráfico de distribuição normal dos dados, foi possível apenas a construção do modelo preditivo para o teor de β -glicosídeos, pois para o teor de malonil glicosídeos os dados apresentaram-se muito dispersos em torno da linha tendência, o que geraria um modelo com baixo coeficiente de determinação, não apresentando bom ajuste aos dados obtidos.

Dessa forma, o modelo construído para o teor de β -glicosídeos (Equação 1) apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9807, evidenciando um bom ajuste do modelo aos dados experimentais, dentro da faixa de temperatura e tempos avaliados.

$$TBG = 0,027 + 0,0058 T + 0,0034 t + 0,0023 T.t \quad \text{Equação 1}$$

onde TBG é o teor de β -glicosídeos, T é a temperatura do processamento térmico e t é o tempo de tratamento térmico.

Na Tabela 6 tem-se a análise de variância que valida o modelo de predição apresentado na Equação 1, enquanto a Figura 4 representa a superfície de resposta demonstrando a interação entre as variáveis tempo *versus* temperatura, que, no entanto não foi proporcional. Dessa forma

qualquer uma das faixas de tempo e temperatura avaliados poderia ser utilizada no tratamento térmico do concentrado, pois mantém constantes os teores de β -glicosídeos. Entretanto, observa-se que na literatura (KAO et al., 2004; GRÜN et al., 2001) não há um padrão de comportamento, já que a forma de apresentação do alimento influencia na conversão deste conjugado.

Tabela 6 Análise de variância do processo tendo como resposta o teor de β -glicosídeos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}	p
Regressão Linear	5	0,000387	0,000077	100,11	5,05	0,0001
Resíduos	5	0,000004	0,000001	-		
Falta de ajuste	3	0,000001	0,000001	0,19		
Erro Puro	2	0,000003	0,000002	-		
Total	10	0,000391	-	-		

GL= graus de liberdade; SQ=soma dos quadrados; QM= quadrado médio

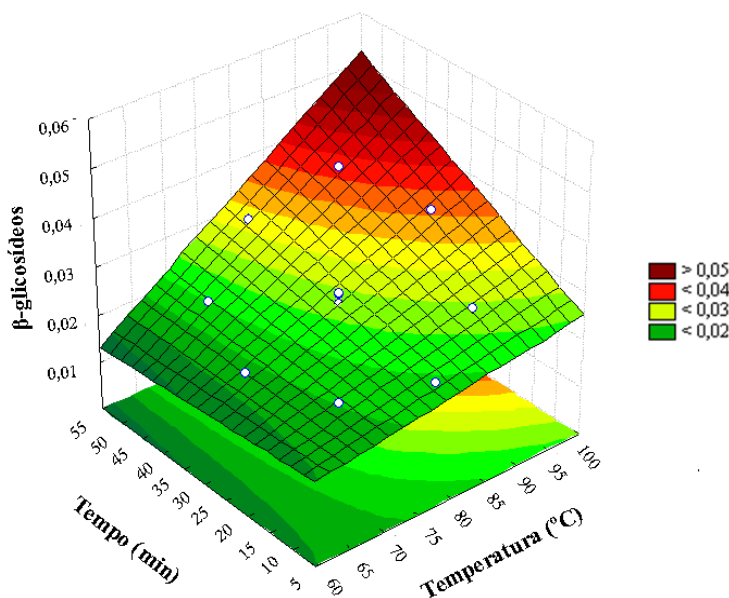


Figura 4 Superfície de resposta para a variação do teor de β -glicosídeos com a temperatura e o tempo.

Na Tabela 7 tem-se a confirmação de que os teores de agliconas não sofreram influências ($p < 0,05$) das variáveis (tempo x temperatura) avaliadas. Esse comportamento foi diferente do encontrado por Carrão-Panizzi, Góes-Favoni e Kikuchi (2004) e Huang, Liang e Kwok (2006) que observaram diminuição nesses isômeros, quando empregados tratamentos térmicos igual a 85 °C e maior do que 95 °C, respectivamente. A diferença nesses comportamentos poderia ser creditada ao tratamento térmico prévio (50 °C por 15 horas) realizado no extrato aquoso de FDS, permitindo a formação das agliconas pela ação da enzima β -glicosidase. A manutenção de agliconas em produtos de soja seria benéfica para a indústria, pois conforme Umphress et al. (2005) e Pascual-Tereza et al. (2006) apresentam propriedades funcionais.

Tabela 7 Análise de variância para as variáveis estudadas tendo como resposta o teor de agliconas.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
(1) Temperatura (L)	0,000001	1	0,000001	0,000028	0,995956
Temperatura (Q)	0,000018	1	0,000018	3,008940	0,143334
(2) Tempo (L)	0,000005	1	0,000005	0,771888	0,419844
Tempo (Q)	0,000002	1	0,000002	0,259385	0,632217
1 (L) x 2(L)	0,000001	1	0,000001	0,115958	0,747301

L = efeito linear; Q = efeito quadrático; *valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O teor de isoflavonas totais permaneceu inalterado ($p > 0,05$) nos tempos e temperaturas avaliados (Tabela 8). Mathias et al. (2006), afirmam que os teores de isoflavonas totais são mantidos devido às interconversões entre os diferentes isômeros, quando utilizadas temperaturas de pasteurização, como foi observado no concentrado. Enfim, pôde-se contatar que a temperatura e o tempo avaliados poderiam ser empregados no concentrado visando possível aplicação em alimentos.

Tabela 8 Análise de variância para as variáveis estudadas tendo como resposta o teor de isoflavonas totais.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado o médio	F	p
(1) Temperatura (L)	0,000020	1	0,000020	0,433728	0,539278
Temperatura (Q)	0,000199	1	0,000199	4,253229	0,094153
(2) Tempo (L)	0,000001	1	0,000001	0,028554	0,872436
Tempo (Q)	0,000012	1	0,000012	0,252319	0,636783
1 (L) x 2(L)	0,000020	1	0,000020	0,433728	0,539278

L = efeito linear; Q = efeito quadrático; *valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO

Os conjugados acetil não foram detectados no concentrado, após os tratamentos térmicos utilizados. Nos conjugados malonil glicosídeos e β -glicosídeos foram observados comportamentos diferenciados diante dos tratamentos térmicos utilizados, sendo que os primeiros foram influenciados somente pela temperatura, enquanto os segundos pelo tempo e temperatura, bem como pela interação destes. Os teores de agliconas e de isoflavonas totais, nos concentrados tratados termicamente, não diferiram, demonstrando que os binômios temperatura *versus* tempo, utilizados neste trabalho, não foram suficientes para degradá-los. Por fim, devido os teores de isoflavonas apresentados pelo concentrado, recomenda-se o emprego dos tratamentos térmicos nas faixas de temperatura e tempo utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.J.B.; ANTHONY, M.S.; CLINE, M.; WASHBURN, S.A.; GARNER, S.C. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. **Public Health Nutrition**, v.2, n.4, p. 489–504, 1999.
- BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.2466-2474, 1994.
- BARNES, S.; CWARD, L.; KIRK, M.; SFAKIANOS, J. HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. **Proceeding of Society Experimental Biology Medicine**, v.217, p.263-273, 1998.
- BERHOW, M.A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B.S.; MANTHEY, J.A. **Flavonoids in the Living Cell**. New York: Klusher, 2002. 505 p.
- CARRÃO-PANIZZLI, M. C.; FAVONI, S.P.G.; KIKUCHI, A. Extraction time for isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.45, n.4, p.515-518, 2002.
- CARRÃO-PANIZZLI, M.C.; SIMÃO, A.S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.8, p.897-902, 2003.
- CHIEN, J.T.; HSIEH, H.C.; KAO, T.H.; CHEN, B.H. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. **Food Chemistry**, v.91, p.425-434, 2005.
- EISEN, B.; UNGAR, Y.; SHIMONI, E. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51. n.8., p.2212-2215, 2003.

FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA, K.; KAWAKURAI, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **Food and Chemical Toxicology**, v.34, p.457-461, 1996.

GOULAS, A.K.; GRANDISON, A.S.; RASTALL, R.A. Fractionation of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p.675-680, 2003.

GRÜN, I.U.; ADHIKARI, K.; LI, C.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J.; FERNANDO, L.N. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.6, p. 2839-2843, 2001.

HUANG, H.; LIANG, H.; KWOK. Effect of thermal processing on genistein, daidzein and glycitein content in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.1110-1114, 2006.

JACKSON, C.J.C.; DINI, J.P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H.P.V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZEL, D.; DEGRANDIS, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v.37, p.1117-1123, 2002.

KAO, T.H.; LU, Y.F.; HSIEH, H.C.; CHEN, B.H. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. **Food Research International**, v.37, p.891-900, 2004.

LISSIN, L.W.; COOKE, J.P. Phytoestrogens and cardiovascular health. **Journal of the American College of Cardiology**, v.35, n.6, p.1403-1410, 2000.

MATHIAS, K.; ISMAIL, B.; CORVALAN, C.M.; HAYES, K.D. Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.54, n.20, p.7495-7502, 2006.

MESSINA, M.; BARNES, S.; SETCHELL, K.D. Phyto-oestrogens and breast cancer. **Lancet**, v.2, p.350-971, 1997.

- MURPHY, P. A.; BARUA, K.; HAUCK, C. C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavonas in soy foods. **Journal of Chromatography B**, v.777, p.129-138, 2002.
- NUFER, K.R.; ISMAIL, B.; HAYES, K.D. The effects of processing and extraction conditions on content, profile, and stability of isoflavones in a soymilk system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57. n.4., p.1213-1218, 2009.
- PASCUAL-TERESA, S.; HALLUND, T.J.; TALBOT, D.; SCHROOT, J.; WILLIAMS, C.M.; BUGEL, S.; CASSIDY, A. Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p.257-264, 2006.
- PETERSEN, R.J. Composite reverse osmosis and nanofiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v.83, p.81-150, 1993.
- ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects. **Food Chemistry**, v.93, p.557-564, 2005.
- SHAO, S.; DUNCAN, A.M.; YANG, R.; MARCONE, M.F.; RAJCAN, I.; TSAO, R. Tracking isoflavones: From soybean to soy flour, soy protein isolates to functional soy bread. **Journal of Functional Foods**, v.1, p.119-127, 2009.
- SUTIL, G. A.; MANDARINO, J.M.; LAURINDO, J.B.; BENASSI, V.; GÓES-FAVONI, S.; PETRUS, J.C.C. Effect of hidothermal treatment and pH on the formation of aglycones em soybean. **European Food Research and Technology**, v.227, p.1729-1731, 2008.
- TODA, T.; SAKAMOTO, A.; TAKAYANAGI, T.; YOKOTSUKA, K. Changes in isoflavone compositions of soybean foods during cooking process. **Food Science and Technology Research**, v.6, n.4, p.314-319, 2000.
- UMPHRESS, S.T.; MURPHY, S.P.; FRANKE, A.A.; CUSTER, L.J.; BLITZ, C.L. Isoflavone content of foods with soy additives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.533-550, 2005.

UNGAR, Y.; OLUWATOYIN, F.; SHIMONI, E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.51, p. 4394-4399, 2003.

VINCZE, I.; VATAI, G. Application of nanofiltration for coffee extract concentration. **Desalination**, v.162, p.287-294, 2004.

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.8, p.1666-1673, 1994.

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.8, p.2377-2383, 1996.

WANG, X.L.; SHANG, W.J.; WANG, D.X.; WU, L.; TU, C.H. Characterization and applications of nanofiltration membranes: State of the art. **Desalination**, v.236, p.316-326, 2009.

WARCZOK, J.; FERNANDO, M.; LÓPEZ, F.; GÜELL. Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. **Journal of Food Engineering**, v.63, p.63-70, 2004.